

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

ADRIANO VITTI MOTA

**Identificação de espermatozóides
portadores do cromossomo X em
búfalos (*Bubalus bubalis*)**

Botucatu-SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA

ADRIANO VITTI MOTA

Identificação de espermatozóides portadores do cromossomo X em búfalos (*Bubalus bubalis*)

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus – Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eunice Oba

Botucatu-SP
2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Mota, Adriano Vitti.

**Identificação de espermatozóides portadores do cromossomo X
em búfalos (*Bubalus bubalis*)**

/ Adriano Vitti Mota. – 2005.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.**

Orientador: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504002

1. Búfalo - Reprodução

CDD 636.20824

**Palavras-chave: Búfalo; Congelação ; Espermatozóide; Exame
Andrológico; Sexagem.**

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da FUNDUNESP através do Projeto “Sexagem de Espermatozóides em Búfalos (*Bubalus bubalis*) concedido a Profa. Dra. Eunice Oba

Os animais utilizados neste experimento foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Alcides de Amorim Ramos

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças ao apoio valioso e a colaboração imprescindível de algumas pessoas e, portanto agradeço:

Especialmente aos meus pais Milton G. da Costa Mota e Vera Lucia Vitti Mota que sempre me apoiaram no decorrer deste mestrado, muitas vezes com palavras de consolo e nos momentos de apuros financeiros ocasionados pela falta de bolsa e recursos para tocar o projeto.

Agradeço também de modo especial a Profa. Dra. Eunice Oba pela orientação e ajuda durante o curso do mestrado.

Ao Prof. Dr. Alcides de Amorim Ramos que gentilmente cedeu os animais utilizados no experimento sem os quais este trabalho não seria possível.

Ao Prof. Heraldo César Gonçalves na época Supervisor da Fazenda Lajeado que apoiou grandemente nesse trabalho colocando a disposição todo o aparato da fazenda para auxiliar na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa que permitiu a utilização do microscópio de Fluorescência utilizado neste trabalho.

Aos Professores Marco e Fernanda Alvarenga pela amizade e sugestões que foram de grande importância na elaboração deste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Confinamento, Centro de Bubalinocultura e do Departamento de Reprodução Animal que colaboraram para a execução deste trabalho.

A todos os amigos queridos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho em especial:

**Ana Paula Castro
Edmilson Stella
João Ferreira de Lima Neto
Leandro Rodello
Gustavo Araújo
Jefferson Garcia
Vera Garcia
Valmor de Freitas
Evanilde dos Anjos**

Aos meus parentes e especialmente aos meus pais Milton e Vera e a meus irmãos Rogério, Tiago, Danilo, Marcio e Rafael pelo apoio que sempre deram sem o qual seria muito difícil tocar mais esta empreitada.

Dedico

A minha mãe Vera Lucia Vitti Mota
por ter me dado a vida e as bases
que alicerçam a minha formação.

RESUMO

A fração de espermatozóides X ou Y foi separada por centrifugação em nove diferentes gradientes de Percoll com densidades que variavam entre 0,9 a 1,06g/mL que foi obtida através de solução “stock” de Percoll composta de 11 partes de Percoll em 1 partes de solução contendo KCl (1M), NaH₂PO₄ (0,1M), NaCl (1,5M) e HEPES sódico (23,8µg/mL). Para preparação dos nove diferentes gradientes de Percoll adicionou-se à solução stock a Solução A (do diluente glicina-gema) em diferentes partes. O sêmen foi centrifugado em Percoll 80% em 200xg por 10 minutos, o “pellet” foi depositado sobre os nove gradientes de Percoll, centrifugado a 100xg por 30 minutos. O novo “pellet” formado foi lavado em TES, mesmo diluente em que foi suspenso para congelação, juntamente com os espermatozóides suspensos foi congelado sêmen fresco apenas diluído em meio TES para controle.

Os espermatozóides descongelados do controle e do sêmen tratado foram corados com quinacrina mostarda e quantificados 200 células para obtenção do percentual de espermatozóides portadores do Corpúsculo-F, observando uma diferença média 17,5% entre o grupo tratado e o controle.

A centrifugação apresentou, através de seleção, uma melhora de motilidade, vigor e cauda fortemente dobrada significativa para as partidas que obtiveram boa congelação, quando comparados o grupo tratado ao controle, sem alteração significativa de defeitos de cauda dobrada, peça intermediária e integridade de membrana e com aumento significativos de alterações de acrossôma. Pode-se concluir que a técnica desenvolvida mostrou-se viável para separação de espermatozóides portadores de X dos portadores de Y a serem utilizados em técnicas de IA e principalmente em FIV, eliminando a necessidade de capacitação empregada na técnica.

ABSTRACT

The spermatozoa portion X or Y were separated by centrifugation in nine Percoll's density gradients, ranging from 0.9 to 1.06mg/mL. These gradients were obtained using the Percoll stock and a solution containing KCl (1M), NaH₂PO₄ (0,1M), NaCl (1,5M) and HEPES sodium (23.8µg/mL) in the proportion of 11 parts of Percoll and 1 part of the tampon solution. In order to prepare the nine different Percoll's gradients were added to the Percoll stock the A solution (glycine-yolk) in different proportions. To retire the spermatozoa were used 0.7mL of the buffaloes semen, centrifuged in a 80% Percoll solution for 10 minutes in 200xg, the obtained pellet were put in the nine Percoll's gradients wich was centrifuged for 30 minutes in 100xg. The new pellets were washed by centrifugation in TES extender and suspended for freezing with the control (fresh semen diluted in TES extender).

The frozen-thawed spermatozoa of the control and the treatment group were colored by quinacrine mustard and counted (200 cells), in order to find the spermatozoa percentage with the F-Body, showing a mean difference of 17.5% between the control and the treatment group.

The centrifugation showed, through a selection, an improved value of motility, vigor and coiled tails in lot of good freezers when comparing the treatment group with control, whithout no difference were observed in the pathologic defects as simple bent tails, middle piece and membrane integrity with a significant higher levels of acrosome alterations. In conclusion, the technique developed to separated the X and Y spermatozoa was feasible and useful for the AI and, mostly, in IVF technique in which is dispensable to induce the capacitation of the spermatozoa.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1.
2. Revisão de Literatura.....	4.
2.1. Determinação do sexo em mamíferos.....	4.
2.2. Importância do sexo no melhoramento genético.....	4.
2.2.1. Teste de progêne.....	4.
2.3. Seleção do sexo em espermatozóides.....	8.
2.3.1. Diferença de pH.....	8.
2.3.2. Diferença nas cargas elétricas.....	9.
2.3.3. Diferenças morfológicas do núcleo e cabeça.....	11.
2.3.4. Diferença na velocidade de migração.....	12.
2.3.5. Diferença nos antígenos de superfície.....	13.
2.3.6. Momento da Inseminação.....	15
2.3.7. Touros que apresentam progênes com predominância de macho ou fêmea.	16.
2.3.8. Corpúsculo-F.....	16.
2.3.9. Diferenças no conteúdo de DNA.....	17.
2.3.10. Gradiente de sedimentação.....	21.
2.4. Congelação de sêmen.....	23.
2.4.1. Características físicas do sêmen	23.
2.4.2. Tempo de equilíbrio e congelação.....	25.
2.4.3. Descongelação do sêmen.....	27.
2.4.4. Membranas espermáticas.....	28.
2.4.5. Patologias de cauda.....	29.
2.4.6. Patologias de Acrossoma.....	30.
3. Materiais e Métodos.....	31.
3.1. Animais.....	32
3.2. Local do Experimento.....	32
3.3. Colheita do sêmen.....	31.
3.4. Análise do ejaculado.....	31.

3.5. Preparação dos Gradientes de Percoll.....	32.
3.6. Congelação do sêmen.....	33.
3.7. Avaliação pós-congelação.....	34.
3.8. Espermatozóides normais e anormais.....	34.
3.9. Avaliação da integridade de membrana.....	34.
3.10. Avaliação da Presença do Corpúsculo-F.....	35.
3.11. Análise estatística.....	37.
4. Resultados e Discussão.....	37.
4.1. Motilidade	
4.2. Vigor.....	37.
4.2. Patologias.....	39.
4.2.1. Cauda fortemente dobrada	
4.2.2. Cauda dobrada.....	39.
4.2.3. Defeito de peça intermediária.....	40.
4.2.4. Defeito de acrossoma.....	41.
4.3. Integridade de membrana.....	41.
4.4. Avaliação da presença do Corpúsculo-F.....	42.
5. Conclusão.....	43.
6. Referências Bibliográficas.....	45.

1. Introdução

Os búfalos em muitos países e estados brasileiros apresentam grandes habilidades para produção de carne e leite, sendo também utilizados como força de tração, fornecedor de couro de boa qualidade e esterco para a adubação de solos fracos.

A produtividade bubalina a pasto em nada deixa a desejar a bovina, sendo que o bubalino apresenta maior digestibilidade de forragens grosseiras (ZAVA, 1984), muitas vezes rejeitadas pelos bovinos.

O rebanho mundial de búfalos é de aproximadamente 190 milhões de cabeças, com um crescimento de 1,8% ao ano, estando a maior parte situado na Índia, Paquistão e China (FAO, 2005).

Segundo o IBGE (2005), o rebanho nacional gira em torno de 1 milhão de bubalinos, com um crescimento de 1,5% ao ano, estando 59,7% na região Norte, 16,34% na região Sul e 23,95% divididos em pequenos núcleos nas demais regiões.

No Brasil, a atividade pecuária bubalina apresenta redução na pressão de desmatamento na Floresta Amazônica, pois esta é realizada em sua grande maioria em campos de várzea nativos, ao longo do Rio Amazonas e em seu Delta, com um impacto ambiental mínimo, pois o búfalo apresenta-se bastante integrado a estes ecossistemas (CAMARÃO *et al.*, 2002).

Na região Amazônica a bubalinocultura apresenta-se quase que exclusivamente destinada ao corte, já nas demais regiões do brasileiras, os animais são destinados para produção leiteira (ABCB, 2002).

As primeiras tentativas de seleção do sexo registradas são atribuídas a Hipócrates 500 a 428 a.C. na Grécia, devido à importância cultural e social do sexo masculino na cultura da Grécia antiga. Os gregos definiram que os espermatozoides (SPTZ) do testículo esquerdo originavam os indivíduos do sexo feminino e preconizavam sua retirada, como método para gerar apenas indivíduos do sexo masculino. Atualmente a comunidade médica tem se dedicado ao desenvolvimento de técnicas para a seleção do sexo, devido à necessidade de prevenção das doenças ligadas aos cromossomos sexuais na espécie humana (ZARUTSKIE *et al.* 1989). Existem cerca de 370

anormalidades genéticas herdáveis ligadas ao cromossomo X, que são expressas por filhos que herdam da mãe portadora do cromossomo X com genes anômalos (HOSSEPIAN, 1998).

A utilização das técnicas de inseminação artificial e transferência de embrião, dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda de sistemas de produção mais eficientes, levaram ao desenvolvimento das técnicas de seleção do sexo de espermatozóides e embriões pré-implantados, em espécies de interesse zootécnico. A seleção do sexo tem valor econômico significativo na pecuária de leite e de corte, onde a produtividade dos sistemas é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR *et al.*, 1985 *apud* HOSSEPIAN, 1998; VAN VLECK *et al.*, 1987). A seleção do sexo de espermatozóides ou embriões deverá acelerar o melhoramento genético animal, pois aumentará o ganho genético anual (NICHOLAS & SMITH, 1983; VAN VLECK *et al.*, 1987).

A utilização de sêmen sexado em búfalos poderá aumentar a eficiência dos programas de melhoramento genético desta espécie além de diminuir os custos da produção leiteira.

O objetivo deste estudo foi identificar os espermatozóides portadores do cromossomo X através da centrifugação em nove diferentes gradientes de Percoll, bem como avaliar a motilidade, vigor patologias espermáticas e integridade de membrana antes e depois da congelação do sêmen. Além disso, verificar a eficácia da técnica modificada e contribuir para otimização da utilização de espermatozóides portadores do cromossomo X de animais de alto valor genético e até mesmo daqueles em perigo de extinção.

2. Revisão de literatura

2.1. Determinação do sexo cromossômico em mamíferos

Aristóteles (~350 a.C.) propôs que o sexo era determinado pelo calor do parceiro masculino e que as fêmeas seriam machos cujo desenvolvimento foi sustado precocemente porque o frio do útero superou o calor do sêmen paterno. Esta visão foi se alterando a partir do século XVI, mas a idéia de como o sexo era determinado ainda não estava clara. Até o início do século XX acreditava-se que a determinação do sexo sofria influência direta do meio ambiente, sendo a temperatura e a nutrição, fatores importantes nesta definição.

No o início do século XX a determinação do sexo era atribuída apenas ao cromossomo X, sendo o macho X0 e a fêmea XX. Somente em 1914, Bridges descobriu que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X com outro morfologicamente distinto, denominando-o de Y.

2.2 Importância do sexo no melhoramento genético

2.2.1. Teste de progênie

Nicholas & Smith (1983) demonstraram que a seleção do sexo é particularmente importante no sistema moderno de teste de progênie, efetuado em núcleos de criação. Este sistema se aplica à transferência de embrião (MOET do inglês *multiple ovulation and embryo transfer*) para reduzir o intervalo entre gerações, aumentar a intensidade de seleção e, conseqüentemente, maximizar o progresso genético. Adota-se: a) os esquemas de *pedigree* (ou esquema juvenil) em que se seleciona a progênie, produtos de transferência de embrião (TE), aos 12 –13 meses de idade, com base na produção materna (a doadora) na 1ª lactação, ou b) esquema dos irmãos (ou esquema adulto), em que a seleção dos futuros reprodutores (produtos de TE) é adiada até que suas irmãs completem a 1ª lactação. Neste

caso, seleciona-se com base em um índice que considera o desempenho materno e o das irmãs.

O teste de progênie, utilizando MOET, envolve grande número de transferência por ano (acima de 1000), para que o índice de consangüinidade do núcleo de criação mantenha-se comparável aos testes tradicionais 0,0001 a 0,002 (por ano), que abrangem vários rebanhos. A seleção do sexo dos espermatozoides associada à múltiplas ovulações e criopreservação de embriões reduz os custos e dinamiza este sistema devido a: a) redução do número de transferências de embriões do sexo masculino em até 33%, restringindo-se aqueles de mães e/ou irmãs com melhor desempenho reprodutivo; b) produção de uma população geneticamente adequada para acasalamento, em menor espaço de tempo e com número mínimo de transferências, já que se utilizariam apenas os embriões do sexo feminino e masculino de mães e irmãs com melhor desempenho produtivo. Este procedimento poderia inclusive reduzir o índice de consangüinidade para 0,002 a 0,0012 por ano (sem a necessidade de elevar-se o número de TE), se a taxa de concepção e sobrevivência mantiverem-se acima de 70%.

Van Vleck *et al.* (1987) demonstraram que o ganho genético depende: a) de quão corretamente os animais são avaliados (ou r_{AA} = acuidade de predição do valor genético aditivo); b) do número de animais selecionados (ou i = intensidade de seleção); c) da amplitude das diferenças genéticas entre os animais avaliados (ou σ_A = desvio padrão dos valores genéticos aditivos); d) da dinâmica de reposição dos animais progenitores por seus descendentes (ou L =intervalo entre gerações).

Estes fatores compõem a equação de predição do progresso genético por ano (em unidade de desvio padrão) ou ganho genético por ano (Δg):

$$\Delta g = \frac{\text{acuidade de predição } (r_{A,A}) \times \text{intensidade de seleção } (i) \times \text{desvio padrão genético aditivo } (\sigma_A)}{\text{intervalo entre gerações em anos } (L)}$$

$$\text{então } Dg = \frac{r_{A,A} \times i \times \sigma_A}{L}$$

Van Vleck *et al.* (1987)

Assim, o progresso genético é alterado quando algum dos fatores desta equação for alterado. Por exemplo, aumentando-se o intervalo entre gerações, diminuir-se-á a acuidade de predição, pois menor número de dados sobre a produção estarão disponíveis para a avaliação genética do rebanho. Da mesma forma, maximizar-se-á a intensidade de seleção se um número maior de animais do mesmo sexo e idade forem selecionados concomitantemente. Os fatores da equação podem ser diferentes considerando-se a seleção de machos ou fêmeas. Considerando-se estas diferenças, o progresso genético será predito pela média da superioridade dos machos e fêmeas selecionados, dividido pelos respectivos intervalos médios entre gerações:

$$\text{Progresso genético} = \frac{\text{Superioridade dos machos selecionados} + \text{superioridade das fêmeas selecionadas}}{2} \div \frac{\text{intervalo entre gerações para machos} + \text{intervalo entre gerações para fêmeas}}{2}$$

onde:

$$\text{superioridade dos machos selecionados} = \text{acuidade de seleção para machos} \times \text{intensidade de seleção para machos} \times \text{desvio padrão genético aditivo}$$

e

$$\text{superioridade das fêmeas selecionadas} = \text{acuidade de seleção para fêmeas} \times \text{intensidade de seleção para fêmeas} \times \text{desvio padrão genético aditivo}$$

Estes benefícios são mais evidentes quando se considera que existem fatores ($r_{A,A; i}$) na equação que podem diferir entre machos e fêmeas, se a característica selecionada não puder ser mensurada em apenas um dos sexos (por exemplo, a produção de leite), e que neste caso, a seleção é feita em

quatro níveis: seleção de reprodutores para produção de reprodutores (SS); seleção de reprodutores para produção de matrizes (SD); seleção de matrizes para produção reprodutores (DS); seleção de matrizes para produção de matrizes (DD). Nesta situação, o progresso genético esperado por ano é dado pela somatória da superioridade médias dos machos e fêmeas para cada geração, dividido pelo intervalo médio entre gerações (RENDEL & ROBERTSON, 1950 *apud* HOSSEPIAN, 1998). Considerando-se que S e D são respectivamente os valores genéticos aditivos médios dos reprodutores e matrizes selecionados para produzir a próxima geração, teremos:

$$\Delta g = \frac{\Delta SS + \Delta SD + \Delta DS + \Delta DD}{LSS + LSD + LDS + LDD},$$

que representa a superioridade média devido a seleção em quatro níveis (SS, SD, DS, DD), dividido pelo intervalo médio entre gerações (LSS+ LSD+LDS+ LDD)

onde: $\Delta S = r_{AS,AS} \times i_s \times \sigma_A$ ou

superioridade genética dos touros selecionados	=	acuidade de avaliação de reprodutores	X	intensidade de seleção de reprodutores	X	desvio padrão genético aditivo
--	---	---------------------------------------	---	--	---	--------------------------------

e similarmente,

ΔD = superioridade genética das matrizes selecionadas

Com base nessas considerações, Van Vleck *et al.* (1987) compararam quatro programas de criação para produção de leite e demonstraram que o progresso genético é maximizado naqueles em que o sexo é controlado (por ocasião da inseminação artificial), obtendo-se machos ou fêmeas quando desejado (Quadro 1).

Quadro 1- Comparação do progresso genético potencial em quatro programas de criação para produção de leite

Programa de criação	Fração selecionada por nível				Progresso genético/ano em Libras de leite devido a seleção no nível DD	Valor Bruto do acasalamento
	SS	SD	DS	DD		
Inseminação artificial (IA)	0,04	0,20	0,06	0,90	220	79lb
IA com controle de seco (IA CS)	0,04	0,20	0,03	0,45	253	358lb
IA e transferência de embrião (IA TE)	0,04	0,20	0,01	0,10	296	713lb
(IA CS TE)	0,04	0,20	0,005	0,05	367	838lb
Acuidade	0,79	0,79	0,65	0,65		
Intervalo entre gerações	5	5	7	7		

Van Vleck *et al.*1987

2.3. Fatores relacionados com a incidência do sexo

A separação dos espermatozoides portadores do cromossomo X daqueles portadores do cromossomo Y baseia-se na detecção de pelo menos uma das seguintes diferenças fenotípicas entre esses dois tipos de célula: sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960), carga elétrica da superfície da membrana (SCHREDER, 1934; KANEKO *et al.*, 1984), morfologia do núcleo e cabeça (SHETTLES, 1960, 1961), antígenos de superfície (KOO *et al.*, 1973), velocidade de migração (ERICSSON *et al.*, 1973), conteúdo de DNA e diferenças na densidade (MEISTRICH, 1982, *apud* WINDSOR *et al.*, 1993).

2.3.1. Diferença de pH

Em 1932, Unterberger sugeriu que um fluído seminal muito alcalino favoreceria a sobrevivência dos espermatozóides portadores do cromossomo Y e que uma vagina muito ácida favoreceria os portadores do X. Shettles (1970) é um dos proponentes da teoria que, na espécie humana, alteração do pH do fluído vaginal pode desviar a proporção sexual. Ele observou que quando o fluído cervical era alcalino ou ácido ocorria a preponderância de meninos ou meninas, respectivamente. Além disso, por ocasião da ovulação, o muco cervical era mais alcalino e o pH ácido prevalecia durante o ciclo menstrual, exceto um dia antes e um após a ovulação. Concluiu-se que embora os espermatozóides X ou Y tenham sobrevivido por um período maior no pH levemente alcalino, encontrado por ocasião da fecundação, o portador do cromossomo Y migrava mais rápido sob esta condição e alcançava primeiro o óvulo. Caso o coito ocorresse nas fases em que o pH é mais ácido, os espermatozóides portadores de X sobreviveriam preferencialmente e fertilizariam o óvulo. Este mesmo concluiu que a hora do coito, em relação a ovulação, e a ducha vaginal com solução ácida ou solução alcalina podiam desviar a proporção sexual em favor do sexo feminino ou masculino, respectivamente.

Kleegman (1966) estudou dados de casos clínicos em que foi utilizada inseminação natural ou artificial, na tentativa de se desviar a proporção sexual. Nos casos em que a inseminação foi efetuada 36 ou mais horas antes da ovulação, ocorreu o nascimento de cerca de 70% de indivíduos do sexo feminino. Quando a inseminação ocorreu de 2 a 24 horas antes da ovulação, houve o nascimento de cerca de 70% de indivíduos do sexo masculino. Estes resultados são consistentes com a teoria de que os espermatozóides Y poderiam ser favorecidos pelo meio alcalino, característico do período da ovulação.

Wakim (1972) demonstrou que a proporção sexual pode ser alterada em coelhos de acordo com o pH da vagina na hora do acasalamento. Quando o pH estava em torno de 6,5 a 7,3 ou 7,5 a 8,3 prevaleceram os sexos feminino e masculino, respectivamente. Os pH entre 7,3 a 7,5 não alteraram significativamente a proporção sexual.

Resultados contrastantes foram obtidos por Diasio & Glass (1971) ao estudarem a migração de espermatozóides humanos em meio Tyrodes com pH variando entre 6,5 a 8,4, como o muco cervical. O meio foi colocado dentro de tubos capilares e esses foram mergulhados verticalmente em sêmen fresco para verificar possíveis diferenças de migração dos espermatozóides portadores do cromossomo Y. O conteúdo do tubo foi corado com Quinacrina mustarda que revela o corpúsculo-F, localizado no cromossomo Y. Sob estas condições, não foi observada nenhuma diferença na migração. Posteriormente, experimentos semelhantes foram efetuados com espermatozóides de animais de laboratório (MUEHLEIS & LONG, 1976) e da espécie humana (DOWING & BLACK, 1976). O tratamento dos espermatozóides em meio alcalino ou ácido, antes da inseminação, não alterou a proporção sexual.

Emmens (1960) submeteu o sêmen de coelhos aos pH de 5,4 a 6,2 ou de 9,0 a 9,8 por um período de uma a três horas, antes da inseminação, porém a proporção sexual dos láparos não foi alterada.

2.3.2. Diferença de carga elétrica

Em mamíferos, os espermatozóides possuem carga elétrica negativa, como demonstrado por eletroforese em espermatozóides de humanos e de coelho (MUDD & MUDD, 1929; VERES, 1968). Nevo *et al.* (1961) demonstraram que espermatozóides de bovinos migravam para o ânodo com a cauda estendida para frente. Isto indicou que eles tinham carga elétrica negativa e esta era mais concentrada na cauda do que na cabeça. Estes indícios foram confirmados por Yanagimachi *et al.* (1972), demonstrando que o hidróxido de ferro coloidal ligava-se preponderantemente à cauda dos espermatozóides de várias espécies, inclusive em bovinos. Kaneko *et al.* (1984), pela análise da carga elétrica da superfície celular de espermatozóides da espécie humana por eletroforese, obtiveram resultados que indicaram que a motilidade eletroforética dos portadores do cromossomo X, é maior que a dos portadores do cromossomo Y. O tratamento com sialidase causou redução progressiva na motilidade eletroforética dos dois tipos de espermatozóides, até que ambos migrassem com a mesma motilidade para um único ponto, sugerindo que as diferenças nas cargas elétricas entre os dois tipos de espermatozóides deve-se

principalmente ao conteúdo de ácido siálico da superfície celular. Já Engelmann *et al.* (1988) obtiveram resultados contraditórios, constatando que a mobilidade eletroforética dos espermatozóides Y era maior que a dos portadores de X. Procurando esclarecer esta controvérsia, Ishijima *et al.* (1991) mediram o potencial Zeta dos espermatozóides X e Y por espectrofotometria e separaram as duas populações por eletroforese, verificando a acuidade do método por coloração com Quinacrina mustarda. O potencial Zeta na fração contendo mais de 80% de espermatozóides Y e 95% de espermatozóides X, sendo o potencial Zeta de aproximadamente 16mV negativos e 20mV negativos, respectivamente.

Em 1957 Gordon realizou experimento na tentativa de separar espermatozóides em portadores do cromossomo X daqueles com cromossomo Y através de eletroforese, obteve 62% de fêmeas e 25% de machos entre os produtos nascidos a partir de inseminação artificial, utilizando os espermatozóides que migraram para o ânodo e cátodo, respectivamente. Battacharya *et al.* (1977) utilizando a força de fluxo contrário que avalia a polaridade dos espermatozóides em uma câmara de fluxo elétrico a 6° C com cargas contrárias, obteve uma precisão de 87% para machos e 62% para fêmeas. Knaack *et al.* (1973) fracionando eletroforicamente o ejaculado de touros de diferentes raças obteve: fração A na qual predominou espermatozóides pequenos (machos determinante), fração B onde predominavam espermatozóides grandes (fêmeas determinantes) e fração C com mistura das frações A e B. Em um primeiro experimento, inseminou 107 vacas com sêmen das frações A e B separadamente, resultando em 85% de bezerros e 73% de bezerras, respectivamente. No segundo experimento foram inseminados 439 vacas, com sêmen das frações A, B e C, nascendo 72,2% , 67,8 e 59,7% de machos. Blottner *et al.* (1983), utilizando a técnica deflação eletroforética, relataram relativo sucesso na separação dos gametas masculinos através de migração, detectando duas frações, uma de migração mais rápida e outra mais lenta. Utilizando a fração de migração lenta (porção catódica) em inseminação artificial, a relação entre sexos para 1.185 bezerros nascidos foi de 49,6% de machos e 50,45% de fêmeas. Para 1.265 bezerros provenientes da inseminação com fração mais rápida (porção anódica), observaram 56,6% de bezerros machos e 43,4% de fêmeas. Segundo Sarkar

(1984) existe uma variação muito grande quanto ao processo de sexagem através de fluxo elétrico, obtendo níveis que vão de 12 a 80% de espermatozoides. Já Vesselinovit *et al.* (1959), ao inseminar 164 vacas com sêmen de 10 diferentes touros, separados por eletroforese com diluente a base de leite, obteve 78% de prenhez, onde as vacas prenhes através do sêmen da fração catódica apresentaram 1,53% a mais de machos do que os da fração anódica, valor este não significativo estatisticamente.

2.3.3. Diferença morfológica do núcleo e da cabeça dos espermatozoides

Na espécie humana, (SHETTLES, 1960, 1961) identificou dois tipos morfológicos de espermatozoides, por coloração com Feulgen e análise por microscopia óptica. Um tipo maior, com a cabeça ovalada e o outro tipo menor, com a cabeça arredondada. A observação de amostras de espermatozoides dos homens de famílias que têm somente filhos do sexo masculino por várias gerações, demonstrou uma grande proporção de espermatozoides deste último tipo. Sugeriu-se que o menor tamanho, desta sub-população de espermatozoides, deve-se ao fato de que o cromossomo Y é menor do que o X. Por outro lado, homens com vários filhos do sexo feminino possuíam maior proporção de espermatozoides com cabeça ovalada. Em estudos subsequentes em coelhos (MUEHLEIS & LONG, 1976) e na espécie humana; Von Porstmann *et al.*, 1979 *apud* Hossepian (1998), não detectaram a presença de dimorfismo entre os espermatozoides X ou Y.

Técnicas atuais, utilizando análise computadorizada, conseguiram obter 10% de enriquecimento de espermatozoides X ou Y através da diferença do volume espermático, apesar do embasamento teórico da técnica, que afirma uma diferença volumétrica da cabeça dos espermatozoides devido a variação de 3,8% no conteúdo do DNA em 80% das células X e Y. Esta técnica apresenta a problemática da necessidade de decapitação dos espermatozoides para avaliação volumétrica, apresentando pouca validade prática na obtenção de produtos sexados (VAN MUNTER *et al.*, 1999).

Battacharya *et al.* (1977) tentaram separar espermatozoides em portadores do cromossomo X ou Y utilizando a centrifugação e filtração através das

diferenças dos espermatozóides Y, mais leves e menores, que os portadores do cromossomo X, não obtendo êxito, devido estas características serem influenciadas por produtos metabólicos como CO₂, H₂O e NH₃.

2.3.4. Diferença na velocidade de migração

Com base nas diferenças de peso e tamanho, Schilling (1966) separou espermatozóides X ou Y de bovinos pela diferença de velocidade de migração, através de meio viscoso composto de gema de ovo e solução salina, com gravidade específica em torno de 1,037 a 1,044g/mL. O meio foi colocado em um tubo e os espermatozóides sobre o meio, onde permaneceram por 1 hora a 0°C. Após este período, os espermatozóides puderam ser encontrados em 12 frações. As frações superiores foram descartadas e as inferiores foram centrifugadas a 4000 rpm por 154 minutos. Após este processo obteve-se uma fração de cerca de 1,5 mL contendo aproximadamente 40 a 80x10⁶ espermatozóides, que foram utilizados para inseminação artificial. Obtendo índice de prenhez de cerca de 67% a 70 % de fêmeas.

Na espécie humana, Ericsson *et al.* (1973) demonstraram que os espermatozóides X ou Y, diferem quanto a motilidade progressiva quando colocados em meio de cultura contendo albumina sérica bovina. Os espermatozóides foram diluídos em Tyrode's na proporção de 1:1 (v/v), centrifugados a 4000 rpm e ressuspensão na concentração de 10⁸. Uma coluna de meio com pH entre 7,4 a 7,6 contendo albumina em concentrações que variaram entre 3% a 25%, foi feita dentro de uma pipeta de Pasteur. Sobre esta coluna foram colocados 50x10⁶ espermatozóides. Após 1 hora, os espermatozóides da fração superior foram descartados, e os da fração inferior foram submetidos ao mesmo processo de separação pela segunda vez. Mais de 85% dos espermatozóides da fração inferior apresentaram corpúsculo-F. Porém, Evans *et al.* (1975) e Wang *et al.* (1994) *apud* Hossepian (1998), seguindo a metodologia de Ericsson *et al.* (1973), obtiveram resultados inferiores a 32%. Em bovinos, Beal *et al.* (1984) e Zavos (1985) em coelhos, não conseguiram desviar a proporção sexual após tratamento dos espermatozóides com a técnica descrita por Ericsson *et al.* (1973). Porém, White *et al.* (1984) e Windsor *et al.* (1993), observaram um desvio na proporção

sexual em pequeno numero de ovelhas, repetindo o mesmo experimento em larga escala (196 ovelha que foram inseminadas com espermatozoides da fração inferior de espermatozoides e 199 que foram inseminadas com a fração superior), obtiveram proporção sexual de 58% de machos, na fração inferior, e 55% de machos na fração superior, sendo pouco significativa. Berck *et al.* (1976) utilizando deslocamento de 90 mm induzido por 17β -estradiol em pipeta de vidro, observaram um aumento de 43,7% para 63,3% de espermatozoides portadores de Y. Resultados semelhantes foram encontrados por Sarkar (1984).

Em coelhos, Windsor *et al.* (1993) não observaram desvio significativo da proporção sexual ao submeterem os espermatozoides a sete diferentes tratamentos de velocidade de migração e verificação dos resultados por citometria de fluxo.

2.3.5. Diferença entre os antígenos de superfície

Baseia-se no uso de anticorpos específicos para o antígeno H-Y, um antígeno de transplantação específico do sexo masculino e bem representado na superfície dos espermatozoides (WACHTEL, 1983).

A presença do antígeno H-Y na membrana dos espermatozoides foi relatada pela primeira vez por Goldeberg *et al.* (1971), em camundongos. Neste trabalho a autora incubou espermatozoides em meio de cultura contendo anticorpo anti H-Y e, em seguida, adicionou complemento. Os espermatozoides que expressavam o antígeno H-Y foram lisados, como determinado pela coloração com azul Trypan. Como cerca de 50% de espermatozoides foram lisados, aventou-se a hipótese de que poderia haver a expressão haplóide do antígeno H-Y na membrana de espermatozoides de outras espécies, o que foi confirmado por Zaborski *et al.* (1979).

Estudos para verificar esta hipótese foram conduzidos em camundongos por Bennet & Boyse (1973), empregando a inseminação artificial com sêmen tratado com anticorpos para o antígeno H-Y. Os anticorpos foram obtidos através de enxerto de pele de machos, em fêmeas de linhagens isogênicas. O soro anti H-Y, assim obtido foi adicionado ao sêmen previamente à inseminação artificial. Mediante esta técnica, conseguiram uma progênie de

45,55% de machos, em comparação com 53,4% do grupo controle. Estudos com camundongos demonstraram que o tratamento com H-Y e complemento, antes da inseminação artificial, proporcionou um desvio pequeno (8%), mas significativo, na proporção sexual (50:50), em favor das fêmeas. Em seguida, Hoppe & Koo (1984) não obtiveram desvio na proporção sexual quando em fecundação *in vitro*, utilizando espermatozóides de camundongos submetidos a este tratamento.

Apesar da existência de diversos mecanismos biológicos para prevenir a expressão haplóide (OHNO, 1982), e da possível troca de mRNA devido a presença de pontes citoplasmáticas entre as espermátides X e Y (ERICKSSON *et al.*, 1981), existem evidências a favor da atividade gênica das células germinativas (BRADLEY, 1989). Este autor referiu-se a vários genes que se expressam no genoma haplóide das células germinativas; e relatou que espermatozóides murinos, retidos em uma coluna de imunoafinidade para o antígeno H-Y, produziram 90% de machos quando utilizados em inseminação artificial. Em ovinos, cerca de 70-80% dos espermatozóides que não se ligaram à coluna, não apresentaram fluorescência (H-Y negativo), e cerca de 80% dos aderidos à coluna apresentaram fluorescência (H-Y positivo) após o tratamento com o antígeno anti H - Y e anticorpo conjugado.

Em 1989, Bradley separou espermatozóides de bovinos de acordo com a expressão do antígeno H-Y, tratando com anticorpos monoclonais anti H-Y e anticorpos conjugados. Obtendo fluorescência de 40 a 65% dos espermatozóides do grupo tratamento e 1 a 15% de fluorescência nos do grupo controle, sendo considerados portadores do cromossomo Y os que apresentaram fluorescência positiva, posteriormente separados dos não fluorescentes, foram corados com corante de Feugen e quantificados através de microdensitômetro, obtendo um resultado de 80% de portadores do cromossomo Y, para os que apresentaram fluorescência e 70% de portadores do cromossomo X, para os que não apresentaram fluorescência.

Ali (1987) sexou espermatozóides de bovino de acordo com a expressão do antígeno H-Y, tratando-os com anticorpo monoclonal anti H -Y e anticorpo conjugado, e submetendo-os a "*Fluorescente activated cell sorted*". Cerca de 8% dos espermatozóides fluorescentes (H-Y positivo), eram portadores do

cromossomo Y e 70% dos não fluorescentes (H-Y negativo) eram portadores do X. Recentemente, Peter *et al.* (1993) sugeriram que a separação dos espermatozoides portadores de X daqueles portadores de Y, utilizando anticorpos monoclonais anti-H-Y associados a cotas de polímeros magnetizados (separação magnética) obtendo acuidade de cerca de 98%.

Existe a possibilidade de espermatozoides X reterem na membrana antígeno H-Y, caso sejam oriundos de espermatogônia H-Y positiva. Esta possibilidade foi aventada por alguns autores para explicar as dificuldades da sexagem de espermatozoides de coelho e bovino por métodos imunológicos (BENNET & BOYSE, 1973; OHNO & WACHTEL, 1978; KOO *et al.*, 1973; ZAVOS, 1983; HOPPE & KOO, 1984).

Recentemente, estudos eletroforéticos da membrana dos espermatozoides X ou Y, separados por citometria de fluxo, demonstraram que não é possível identificar diferenças entre as proteínas de membrana dos portadores do cromossomo X ou Y (HENDRIKSEN *et al.*, 1999).

2.3.6. Momento da inseminação

Este método consiste em fazer a inseminação ou fertilização no início ou fim da ovulação, baseando-se no fato do gameta masculino portador do cromossomo Y ter maior motilidade, e o portador do cromossomo X maior durabilidade.

Gutierrez-Adán *et al.* (1999) observaram em seus experimentos em bovinos, uma proporção macho/fêmea de 1,00: 0,61(machos 37,96%) para embriões com 16 de MIV e 1,67: 1,0(machos 62,5%) com 24h de MIV. Em um segundo experimento com vacas superovuladas e inseminadas observaram mais de 40% de machos quando a inseminação deu-se 5h antes da ovulação e 75% de machos 5 horas após a ovulação, o que leva a crer que este método possa estar mais diretamente relacionado à maturação do oócito do que à velocidade de migração dos diferentes gametas masculinos (X e Y). Contudo, Rorie *et al.*(1999^a,1999^b), detectando o cio de vacas sincronizadas, através do sistema HeatWatch de detecção de estro, inseminando vacas e novilhas 8 a 10 horas e 20 a 25 horas após o estro, e sexagem ultrassonográfica 80 dias

após a inseminação, não obtiveram diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

2.3.7. Touros que apresentam progênes com predominância de filhas

Alguns touros usados na inseminação artificial apresentam um desvio no número de filhas nascidas, em relação ao número de filhos (CRIBIU & POPESCU, 1975). Além do aspecto de quimerismo gônadal, da transferência de grande número de células femininas (gonócitos primordiais do tipo XX) da irmã gêmea para o irmão durante a gestação gemelar de casal pela anastomose dos vasos coriônicos da placenta-comum, quando células femininas teriam sobrevivido e originado conseqüentemente maior número de espermatozoides X do que Y; entretanto, parece que também outros fatores além destes, podem interferir nas explicações deste fenômeno, mesmo em touros não gêmeos (LONG, 1979 *apud* HOSSEPIAN, 1998).

2.3.8. Corpúsculo-F

A técnica do “Corpúsculo-F” baseia-se na fluorescência que o cromossomo Y apresenta quando corado com derivados da acridina (como a Quinacrina) e observado sob luz ultravioleta (DAYAN, 1994). Esta técnica permite visualizar um ponto na região distal do braço curto do cromossomo Y, designado como Corpúsculo-F (ou corpo cromático masculino). Estudos em microscopia eletrônica, entretanto, tem falhado em demonstrar uma diferença estrutural nesta porção do “Y”, porém, Hubner *et al.* (1970), demonstraram que a Quinacrina localiza-se nas áreas mais ricas em guanina e citosina nas hélices de DNA, enfatizando o acima exposto, principalmente para espermatozoides humanos.

A detecção do Corpúsculo-F foi o método mais empregado para validação de técnicas que objetivam sexar espermatozoides (PETER, 1970; PEARSON, 1972; DIASIO & GLASS, 1971; ERICSSON *et al.* 1973; BECK *et al.* 1976; MUEHLEIS & LONG, 1976; DOWING & BLACK, 1976; SHASTRY *et al.* 1977; OGAWA, *et al.* 1988; AMANN, 1989; ISHIJIMA *et al.* 1991 e HOSSEPIAN, 1998).

2.3.9. Diferenças no conteúdo de DNA

Os métodos que utilizam a diferença na quantidade de DNA baseiam-se na evidência de que nos mamíferos, (OHNO *et al.*, 1963; JOHNSON e CLARK, 1990), os espermatozóides carregam o cromossomo X ou Y. O cromossomo X é maior que o Y, devido a maior quantidade de DNA. A quantidade de DNA do cromossomo X em relação ao Y varia significativamente entre as espécies (MORUZZI, 1979; JOHNSON, 1992), sendo que a menor diferença encontrada é de cerca de 2,8% na espécie humana (JOHNSON *et al.*, 1993) e a maior é de 12,5% no *Microtus oregoni* (JOHNSON&CLARKE, 1990). Nos animais domésticos, as diferenças de DNA entre os espermatozóides X ou Y variam de 3,5% a 4,2%, sendo que nos bovinos ela é de cerca de 4,0% (JOHNSON *et al.* 1987; JOHNSON, 1992, 1994). Nesta espécie, observou-se uma diferença média significativa do conteúdo de DNA dos espermatozóides X ou Y entre as raças, mas não entre os indivíduos da mesma raça. Entre os espermatozóides X ou Y de touro Jersey observou-se a maior diferença (4,24%) quando comparada com as raças Angus (4,05), Hereford (4,03%), Holstein (3,98%) e Brahman (3,73%) (HOSSEPIAN, 1998). A diferença significativa encontrada entre *Bos taurus* o Y é um pequeno submetacêntrico e nos *Bos indicus* é um pequeno acrocêntrico.

Na década de 80 iniciaram-se, em mamíferos, as tentativas para a seleção do sexo pela identificação das diferenças na quantidade de cromatina entre os espermatozóides X ou Y por citometria de fluxo (JOHNSON & PINKEL, 1986; JOHNSON *et al.*, 1987).

No citometro de fluxo os espermatozóides passam em fila única através do feixe de "laser" que emite 175mW de ultravioleta (351, 364nm). Os sinais fluorescentes emitidos pelo núcleo dos espermatozóides são coletados simultaneamente, por detectores ópticos posicionados a 0° e 90° em relação a face plana e extremidades da cabeça, respectivamente. Os detectores convertem estes sinais para sinais eletrônicos, que são armazenados no computador como histogramas. Em seguida, o feixe de espermatozóides é

quebrado em gotas pequenas e uniformes por ultra-som emitido por um transdutor. Cada gota contém um único ou alguns espermatozóides.

As gotas contendo um espermatozóide X ou Y (6-8% do total de gotas formadas) são carregadas com carga positiva ou negativa, respectivamente, de acordo com a intensidade de fluorescência. As gotas passam por um campo eletrostático e são separadas em dois tubos distintos. As gotas vazias e aquelas que não estão dentro dos padrões de fluorescência estabelecidos continuam no feixe central e caem em um tubo de descarte (JOHNSON & PINKEL, 1986; JOHNSON, 1992, 1994).

Em mamíferos, as primeiras tentativas para a separação das frações de espermatozóides X ou Y não tiveram sucesso. Era difícil distinguir as pequenas diferenças do conteúdo de DNA entre as populações de espermatozóides X ou Y porque a intensidade do sinal de fluorescência era afetado devido as irregularidades da cromatina compactada, da morfologia da cabeça (achatada e em forma de pá) e da orientação da cabeça dentro do citometro. A intensidade de fluorescência do corante ligado ao DNA era maior na borda do que na face plana do espermatozóide porque a cromatina densa causa um alto índice de refração a excitação do "laser" e aos detectores ópticos que coletam a fluorescência emitida, sendo critica para a resolução. A fim de analisar adequadamente as pequenas diferenças do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y, deve-se usar um citometro de fluxo em que a captação do sinal de fluorescência possa ser controlada de acordo com a orientação da cabeça do espermatozóide em relação a fonte de excitação (JOHNSON & PINKEL, 1986; JOHNSON, 1994).

Assim, modificações no citometro de fluxo convencional (Epics V; Couter Corporation, Hialeah, FL) foram necessárias (JOHNSON & PINKEL, 1986). As modificações consistiram da adaptação de um detector adicional de fluorescência colocado na frente e a 0° do "laser" de modo que o sinal de fluorescência fosse captado em outro ângulo além daquele de 90° do detector do aparelho original. Este sistema modificado orienta corretamente a cabeça dos espermatozóides intactos, de modo que o sinal fluorescente da face plana é captado pelo detector posicionado a 0° em relação ao "laser" e aquele emitido pela extremidade da cabeça é captado pelo detector posicionado a 90° em relação ao "laser". Isto minimiza a heterogeneidade do sinal de fluorescência,

permitindo a separação dos espermatozóides X ou Y. A fluorescência da extremidade é usada para caracterizar a orientação das cabeças de espermatozóides orientados incorretamente, ou seja, com a face plana voltada para o detector o que permite que eles sejam retirados da análise eletronicamente. Em geral, cerca de 65-95% dos espermatozóides intactos estão orientados corretamente em relação ao “laser” e ao detector na posição de 0° (JOHNSON, 1995).

A separação de espermatozóides X ou Y pela técnica de citometria de fluxo, somente foi conseguida a partir de 1987 (JOHNSON *et al.*, 1987; MORELL, 1991).

Johnson *et al.* (1987) separaram as frações de espermatozóides X ou Y de *Chinchilla laniger* com 95% de acuidade em cada fração. Nesta espécie, a diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y foi de cerca de 7,5% e conseguiu-se separar cerca de 132000 espermatozóides por hora.

Johnson *et al.* (1989) separaram as frações de espermatozóides X ou Y de espermatozóides de coelho. Nesta espécie, a diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y é de cerca de 3,0%. As frações de espermatozóides X ou Y foram utilizados para inseminação artificial, obtendo-se 94% de fêmeas e 81% de machos, respectivamente. A capacidade de fecundação dos espermatozóides não foi afetada significativamente pelo tratamento. Em um grupo controle, cerca de cinco oócitos fecundados foram coletados de coelha, 40 horas após a inseminação. Entretanto, obteve-se índice de 28% de prenhez (o esperado para a espécie seria 80%) e 3,9 filhotes por ninhada (o esperado seria 6). Isto pode estar correlacionado com a manipulação do útero durante a inseminação cirúrgica e pelos efeitos do fluorocromo.

Johnson (1991) usando a mesma técnica obteve 74% de fêmeas e 68% de machos inseminando marrãs com as frações de espermatozóides X ou Y, respectivamente. Os espermatozóides (aproximadamente 3×10^5) foram depositados cirurgicamente no oviduto. Nesta espécie, a diferença do conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y foi de cerca de 3,3%. O tamanho da leitegada (7 à 9) com espermatozóides sexados correspondeu a dois ou três leitões a menos do que o número esperado nas inseminações intracervicais com 3×10^7 espermatozóides. Dentre os fatores que podem ter causado essa

diminuição, o autor destacou: a) o pequeno número de espermatozóides utilizado por oviduto (300.000); b) o trauma de cirurgia; c) a inseminação 2-4h após a ovulação (oócitos velhos); d) o local de deposição do sêmen (oviduto), os leitões não apresentaram anormalidades fenotípicas.

Na espécie humana, espermatozóides X ou Y foram separados com acuidade de 82% e 75%, respectivamente, confirmada por hibridização *in situ*. Uma hora após a separação, os espermatozóides tinham motilidade entre 65 a 75% (JOHNSON *et al.*, 1993), semelhante aquela (60 a 80%) encontrada nos animais domésticos para espermatozóides sexados pelo mesmo método (JOHNSON *et al.*, 1989; JOHNSON, 1991).

Cran *et al.* (1993) *apud* Cran (1995) e Welsh *et al.* (1994) utilizaram, pela primeira vez, espermatozóides X ou Y de bovinos, separados por citometria de fluxo para fecundação *in vitro*. Separou-se uma quantia de espermatozóides suficiente para fecundar 100 oócitos (2000/oócito). Os embriões resultantes foram sexados por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que indicou acuidade de 73% e 68% na separação das frações X ou Y. Dezoito embriões foram transferidos para nove novilhas (dois embriões por novilha), das quais quatro (44%) tornaram-se gestantes produzindo três bezerros do sexo masculino e três do sexo feminino.

Apesar da grande acurácia da citometria de fluxo, esta técnica tem como limitante a reduzida produção de doses por hora, três doses convencionais de 10×10^6 , com precisão de 90%, alto investimento do aparelho que custa US\$ 300.000 nos Estados Unidos trazendo um acréscimo de US\$10 a 20 dólares por dose e as lesões provocadas pelo processo: a) exposição do espermatozóide ao corante com afinidade pelo DNA (Hoechst 33342), b) exposição do espermatozóide à energia eletromagnética do laser, c) a força de desaceleração do espermatozóide no aparelho de 90 para 0Km/h, d) o processo de centrifugação para concentração dos espermatozóides (SEIDEL JR, 2003).

2.3.10. Gradiente de sedimentação

O método de sexagem de espermatozóides pelo gradiente de sedimentação também é baseado no princípio de que os espermatozóides contendo o cromossomo X sejam mais pesados do que os portadores do cromossomo Y, devido os espermatozóides X apresentarem em média 3,8% mais DNA que os Y. Este processo consiste na centrifugação do sêmen, aonde este apresentará uma fração de fundo com mais espermatozóides contendo o cromossomo X.

Amann *et al.* (1989), utilizando centrifugação em meio de Albumina sérica conseguiram 85% de espermatozóides portadores do cromossomo Y em humanos, contrariando os resultados de Zavos (1984) que, em coelhos, obteve 55,3% de machos na amostra contra 52,8% no grupo controle, utilizando centrifugação no mesmo meio.

Shastri *et al.* (1977) fizeram estudos de sedimentação em Ficoll-sódio-metrizoato, como meio para separação de espermatozóides humanos em portadores do cromossomo X e Y, utilizando densidades de 1,08g/mL e 1,04g/mL, disposto no mesmo tubo e centrifugado a força de 100g por 20 minutos, obtendo 76,9% de espermatozóides portadores do cromossomo Y no sobrenadante, 80,6% de espermatozóides portadores de X no precipitado, atestados pela observação do corpúsculo-F corado com Quinacrina mostarda.

Kaneko *et al.* (1983) em espermatozóides humanos obtiveram em seis e oito gradientes diferentes 73,1±3,3% e 27,4±3,4% de espermatozóides Y nas frações superior e inferior, respectivamente. Já Schwiderski *et al.* (1991), obtiveram 75% de machos e 92% de fêmeas de embriões de Fertilização *In Vitro* (FIV) obtidos através da utilização de espermatozóides provenientes das frações superior e inferior de diferentes gradientes. Em adição Hossepian (1998) estudando a separação de espermatozóides em detentores dos cromossomos X ou Y, através de sedimentação em diferentes gradientes de Percoll, obteve para nove e doze gradientes diferentes, 74,45% e 74,55%, respectivamente de espermatozóides bovinos portadores do cromossomo X, utilizando para aferir este resultado a maior fluorescência do cromossomo Y quando corado com quinacrina mostarda.

Ramalha *et al.* (2000) objetivando testar a campo a sedimentação em meio de Percoll com nove diferentes gradientes de densidade, utilizando inseminação artificial em vacas holandesas, com os espermatozóides do precipitado, observou motilidade/vigor após a descongelação de 35%/ 4-5 e 40%/4-5, e após Teste de termoresistência rápida (TTR) 25%/3 e 25%/3% com 51% e 55% de acrossômas intactos para o controle e o sêmen sexado, respectivamente, obtendo 52% de prenhez, sendo 85,71% fetos do sexo feminino detectados por exame ultrassonográfico.

2.4. Congelação de sêmen

2.4.1. Características físicas do sêmen

Diversos autores, Ohashi *et al.*(1988), Garcia & Pinto (1991), Amstalden *et al.* (1993), Balieiro (1993), Alexiev *et al.* (1994), Dhama *et al.* (1994); Misra *et al.* (1994) e Chacur (1996) ao estudarem o volume do sêmen de bubalinos, encontraram diferentes médias que variaram entre 1,7 a 3,7 mL. A variação no volume dos ejaculados pode ser influenciada pela raça, idade, tempo de repouso sexual, alimentação, manejo, particularidades individuais e estação do ano (CHACUR, 1996; SOUSA *et al.*, 1998).

Variações fisiológicas ocorrem para a concentração do sêmen. Ohashi *et al.* (1988) descreveram na raça Murrah um valor médio de 960 milhões/mL e 447 milhões/mL, para o primeiro e segundo ejaculados, respectivamente, enquanto, sem caracterizar o primeiro e segundo ejaculados, Garcia & Pinto (1991), obtiveram as médias de 1.700 ± 600 milhões, $1.320 \pm 0,75$ milhões/mL (BALIEIRO, 1993), 1.125 a 1.213 milhões/mL (ALEXIEV *et al.*, 1994), $1.262,21 \pm 93,98$ milhões/mL (DHAMI *et al.*, 1994), 1.496 milhões/mL (MISRA *et al.*, 1994) e $976,33 \pm 374,48$ milhões/mL (CHACUR, 1996; SOUSA *et al.*, 1998).

A coloração do sêmen bubalino varia de esbranquiçado a amarelado (AMSTALDEN *et al.*, 1993; VALE, 1994), às vezes com tom azulado, dependendo da concentração do ejaculado, que pode variar de denso a ralo aquoso (GARCIA & PINTO, 1991; VALE 1994).

Segundo Sousa *et al.* (1998), o turbilhonamento, vigor e motilidade assemelham-se aos de bovino, porém com menor intensidade, sendo o

espermatozóide bubalino mais sensível às mudanças de temperatura. Sêmen de bovinos e bubalinos não apresentam diferenças significativas de patologias espermáticas e quanto a variação da osmolaridade (Romitto *et al.*, 2001).

Poucos trabalhos analisaram o turbilhonamento, mas em pesquisas realizadas na região Amazônica, Vale *et al.* (1997; 1999), observaram para touros normais, no sêmen a fresco, turbilhonamento maior do que três Sousa *et al.* (1998), e Dharni *et al.* (1994), utilizando búfalos Murrah na Índia, descreveram $3,89 \pm 0,22$ de valores de turbilhonamento.

Garcia & Pinto (1991), descreveram uma motilidade média do sêmen bubalino a fresco de 50 à 60%, Amstalden *et al.* (1993), de $65,5 \pm 18,2\%$; Balieiro (1993), de $85,78 \pm 5,97\%$; Alexiev *et al.* (1994) de 71,21%; Misra *et al.* (1994), de 71,4%; Dharni *et al.* (1994) de $87,50 \pm 1,09\%$; Fritsch (1994), de $78,29 \pm 6,29\%$; Chacur (1996), de $78,2 \pm 2,04\%$ e Vale *et al.* (1997; 1999) de 71,1%.

Balieiro (1993) citando trabalhos de (MANIK & MUDGAL, 1984), e (RAIZADA *et al.*, 1990) descreveram na escala de um a cinco, vigor de espermático de dois a 2,8 e 3,3 respectivamente para sêmen de búfalos. Nahum (2001) encontrou média de $3,11 \pm 0,69$ de vigor espermático para bubalinos das raças Murrah e Mediterrânea.

Em animais da raça Mediterrânea, Oba *et al.* (1993) descreveram em seu trabalho realizado no Brasil utilizando o diluidor TES, que a motilidade espermática apresentou um comportamento semelhante antes e após a diluição. Achados similares foram descritos por Chacur (1993) com búfalos da raça Murrah utilizando o mesmo diluidor.

Em bubalinos, diversos pesquisadores utilizaram o Citrato e o TRIS como diluidores, e obtiveram respectiva motilidade média pós-diluição de: $81,50 \pm 0,02\%$ e $86,50 \pm 0,01\%$ (RAHMAN *et al.*, 1988), 69,8% e 73,7% (MOHAN & SAHNI, 1991). No entanto, Fritsch (1994) e Vale *et al.* (1997; 1999) utilizaram TRIS e TES obtendo $82,83 \pm 7,69\%$ e $85,70 \pm 6,74\%$ respectivamente, já Nahum (2001), obteve $75,33 \pm 2,85\%$ com diluente a base de água de coco.

Poucos trabalhos enfocam o vigor espermático, apesar da importância na análise do sêmen. Oba *et al.* (1993) descreveram igualdade de valores entre o TES e TRIS no vigor, atingindo grau quatro.

Fritsch (1994) observou vigor de sêmen diluído no TRIS, onde 38,3% das amostras passaram de grau cinco para quatro, e no diluidor TES, o vigor espermático permaneceu inalterado (grau cinco) em 98,3% das amostras.

Nahúm (2001), constatou vigor médio de 3,55 para sêmen em diluidor a base de água de coco.

O percentual de espermatozóides vivo e de patologias espermáticas, no sêmen a fresco foi avaliados por Dhami *et al.* (1994), determinando valores de $89,39 \pm 0,99\%$ e $8,33 \pm 0,72\%$. Do mesmo modo, Amstalden *et al.* (1993) obtiveram $67,03 \pm 17,25\%$ e $23,60 \pm 20,56\%$, respectivamente. Em outro trabalho, Rahman *et al.* (1988) descreveram valores de anormalidade de acrossôma, no sêmen diluído, a ordem de $19,40 \pm 0,02\%$ no Citrato e $7,60 \pm 0,02\%$ no TRIS. Nahúm (2001), obteve 7,15% de defeitos de acrossôma e 3,38% de defeitos de cauda ao utilizar diluidor a base de água de coco pós – descongelação.

Avaliando o sêmen a fresco, Fritsch (1994) encontrou $1,60 \pm 1,39\%$ de espermatozóides com patologias de acrossôma, tendo um aumento destas patologias no sêmen diluído em TRIS ($2,07 \pm 1,89\%$), e não obtendo diferença nestes valores com o uso de TES ($1,62 \pm 1,59\%$).

As patologias dividem-se em maiores, os quais têm origem na produção espermática, e menores que são referentes à fase de maturação dos espermatozóides (Rao, 1971). A queda da osmolaridade predispõe a um maior aparecimento de anormalidades morfológicas, que ocorrem devido a problemas das glândulas vesiculares e próstata, onde haverá uma grande liberação de fósforo e potássio, sua deficiência pode levar tanto a patologias de ordem maior quanto menor. (ZÜGE *et al.*, 2001).

As características físico-químicas do ejaculado de bubalinos, coletados por vagina artificial, na região Amazônica, estão apresentados na Tabela 1.

2.4.2. Tempo de equilíbrio e congelação

O tempo de equilíbrio total preconizado por Vale *et al.* (1984; 1991) para congelação de sêmen bubalino foi de 3 horas a 4°C. Em adição Bhosrekar *et al.* (1993), utilizando o diluente TRIS, verificaram que o tempo de equilíbrio de três horas mostrou-se superior ao tempo de seis horas onde Vale *et al.* (1984;

1991) e Bhosrekar *et al.* (1993), observaram uma diferença significativa ($p < 0,01$) nos tempos de equilíbrio estudados para parâmetros de motilidade, porcentagem de espermatozóides vivos e de acrossômas íntegros no sêmen de bubalinos.

Bhosrekar *et al.* (1993) demonstraram que a glicerolização realizada em duas etapas (primeiro sem glicerol a temperatura ambiente e depois com glicerol a 4°C), é melhor que a adição de glicerol em somente uma etapa à temperatura ambiente de 20° C, reportando que o nível de enzimas extracelulares aumenta como consequência de injúrias nas células espermáticas. Os autores concluíram que a glicerolização em duas etapas diminui a freqüência de injúrias nas células espermáticas.

O diluidor TES proporciona resultados superiores de viabilidade espermática durante todas as etapas de congelação do sêmen de búfalo em relação ao diluidor TRIS (FRITSCH, 1994), ainda segundo este autor, foi observado que os tempos de equilíbrio de cinco horas e trinta minutos, e sete horas, foram superiores na taxa de motilidade espermática pós-descongelação de 49,88% e 50,50%, respectivamente, quando comparado ao tempo de equilíbrio de quatro horas com motilidade pós-descongelação de 48,75%.

Chacur (1996) testando os tempos de equilíbrio de uma, duas, três, e quatro horas não observou diferença no vigor e motilidade espermática usando os diluentes TES, Glicina-Gema e Triladyl, e da mesma forma o autor não encontrou diferença na manutenção da integridade acrossômica para o meio TES na pós-descongelação, concluindo que estes diluidores são adequados para criopreservação do sêmen bubalino.

Quadro 1 - Características físico-químicas do ejaculado de bubalinos

<i>Características</i>	Valores médios
Cor	Branco, branco leitoso.
Volume (mL)	3 (2 – 8)
Movimento de massa (1-5)	>3
Motilidade (%)	>70
Vigor (1-5)	>3
Concentração (células/mm³)	6 x 10⁶ - 12 x 10⁶
Espermatozóides vivos (%)	>70
Espermatozóides anormais	<30
(%)	
pH	6,7 – 7,5

Fonte : Vale (1994); Sousa *et al.*(1998).

2.4.3. Descongelção do sêmen

Na região Amazônica, Ribeiro *et al.* (1991) e Vale (1994) concluíram que o método mais adequado para descongelção do sêmen bubalino foi de 40°C durante 30 segundos. Balieiro (1993), comparando os métodos de descongelção de 75°C durante 9 segundos, 40°C durante 10 segundos e 37°C durante 30 segundos, não encontrou diferença significativa na motilidade progressiva e integridade acrossômica.

Vale *et al.* (1984), utilizando diluidores à base de TRIS e TES, encontraram motilidade pós - descongelção sempre superior a 40% e vigor três para sêmen de búfalo.

Ohashi (1993), obteve motilidade pós-descongelção no sêmen bubalino, ao utilizar os diluentes Citrato e leite desnatado abaixo de 20% na lactose e cerca de 30%, entretanto reportou, que os melhores resultados obtidos foram com os diluentes TRIS e TES, entre 50 a 60%.

Nahún (2001), observou média de 46% para motilidade no sêmen pós-descongelção, usando diluente com água de coco, contra 52% de motilidade do sêmen diluído com TES pós-descongelção. Em estudos na espécie bubalina, Oba *et al.* (1993), utilizando duas horas de tempo de

equilíbrio a 5° C para a congelação do sêmen, encontraram motilidade pós-descongelação de $67,5 \pm 5,0\%$ para o Glicina-gema, $60,0 \pm 14,1\%$, para o TES e $41,2 \pm 17,5\%$ para o TRIS. Ainda em bubalinos, avaliando os parâmetros vigor e retenção acrossômica, encontraram os respectivos valores de 3 e $60,0 \pm 12,2\%$ no TES, e 2,5 e $57,5 \pm 12,2\%$ no TRIS (OBA *et al.*, 1993).

Em pesquisa com três diluidores, Balieiro (1993), comparou os diluentes TRIS, TES e Citrato em congelação com tempo de equilíbrio de sete horas, encontrando uma motilidade pós-descongelação de 52,7%, 50,5% e 38,9%, respectivamente.

Trabalhando com sêmen da raça mediterrânea criopreservado em TES e TRIS, Fritsch (1994) reportou uma motilidade média pós-descongelação de $73,03 \pm 7,84\%$ e $65,57 \pm 10,73\%$, respectivamente.

Para touros da raça Murrah, Misra *et al.* (1994) obtiveram no TRIS uma motilidade pós-descongelação de 60,8% e Dhama *et al.* (1994), avaliando os diluidores Citrato sem aditivos e TRIS obteve motilidade pós-descongelação de $42,22 \pm 2,92\%$ e $50,56 \pm 2,12\%$, respectivamente. Ainda na raça Murrah, Chacur (1996), utilizando um tempo de equilíbrio de três horas encontrou valores de motilidade pós-descongelação de 65,5% no TES e 61,5% no TRIS.

2.4.4. Membranas espermáticas

Efeitos deletérios sobre o acrossôma do espermatozóide durante a congelação podem ser avaliados no exame da integridade acrossômica, um parâmetro valioso devido à relação do acrossôma com a capacidade de fertilização em mamíferos (HAFEZ, 1997).

De acordo com Garcia & Pinto (1991), as mesmas técnicas utilizadas para bovinos na avaliação da morfologia e anormalidades espermáticas são válidas para bubalinos, não tendo literatura suficiente para assegurar os mesmos limites de anormalidades nas duas espécies. Ainda segundo Garcia & Pinto (1991), a membrana espermática parece ser mais sensível nos bubalinos que nos bovinos, traduzindo-se em maior perda na congelabilidade com a

liberação de enzimas provenientes da lesão celular.

Através de algumas técnicas pode-se avaliar a integridade de membrana dos espermatozóides, verificando as lesões causadas pela manipulação feita nas diversas biotecnias. A coloração de eosina-nigrosina permite verificar a integridade de membrana através da coloração vermelha dos espermatozóides com membrana lesada, que devido esta lesão permite a entrada do corante nas células e as não lesadas não permitem este influxo de corante, não apresentando coloração (CHACUR, 1996). Seguindo o mesmo princípio a coloração com sondas fluorescentes através de ésteres de carboxifluoresceína que penetra a membrana plasmática dos espermatozóides íntegros onde são metabolizados transformando-se em fluoresceína, que não consegue sair da célula fazendo com que esta emita uma coloração verde, e o iodeto de propídio que penetra apenas a membrana lesada, agindo no núcleo liberando um RNAm que codificará as organelas a produzirem uma coloração vermelha (figura 3) (ZÚCCARI, 1998). Uma técnica simples e barata é a do choque osmótico, que consiste em adicionar água destilada em uma alíquota do sêmen a ser analisado, os espermatozóides íntegros sofrem dobramento de cauda e os mortos não, descontando-se o número de espermatozóides dobrados encontrados no espermiograma do número de espermatozóides dobrados encontrados na alíquota com água se obtém o total de espermatozóides íntegros(ZÚCCARI, 1998)

Balieiro (1993) e Fritsch (1994), reportaram que o diluidor TES apresenta uma melhor capacidade de proteção da célula espermática contra injúrias no processo de congelação em relação a outros diluidores. Segundo Balieiro (1993), esta ação protetora deve-se a presença da lactose.

2.4.5. Patologias de cauda

A cauda do gameta masculino é composta de colo, peça intermediária, principal e terminal. O colo ou peça de conexão forma uma placa basal que se ajusta dentro de outra placa basal, a qual ajusta-se dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo. A placa basal do colo é contínua, com nove grosseiras fibras que posteriormente se projetam, através da maior parte da cauda (HAFEZ, 1997).

A região da cauda entre o colo e o *annulus* é a peça intermediária. A parte central da peça intermediária, junto com o comprimento total da cauda forma o axolema. Ele é composto de nove pares de microtúbulos envolvendo 2 filamentos centrais (HAFEZ,1997). Na peça intermediária, estes arranjos de 9+2 microtúbulos estão circundados por nove grossas ou densas fibras que parecem estar associadas com os nove pares de axonemas e as densas fibras associadas da peça intermediária são recobertas externamente por numerosas mitocôndrias. Esta bainha mitocondrial disposta em forma de hélice envolvendo as fibras longitudinais da cauda, gera a energia necessária para a motilidade espermática. A bainha mitocondrial termina no *annulus* (HAFEZ, 1997).

A peça principal, que continua posteriormente ao *annulus* e se estende até a parte terminal da cauda, é composta centralmente do axonema e sua associação de fibras grosseiras. Julga-se que a membrana fibrosa fornece a estabilidade dos elementos contráteis da cauda (HAFEZ, 1997).

A peça terminal, que é posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema recoberto pela membrana plasmática.

O axonema é responsável pela motilidade espermática. Os pares externos de microtúbulos de padrão 9+2 geram a curvatura da onda da cauda por um movimento de deslizamento entre os pares adjacentes (HAFEZ, 1995).

Segundo Mies Filho (1987), a cauda pode apresentar-se com diversos desvios de anormalidades: Caudas simplesmente dobrada (em forma de clave de sol), enrolada na extremidade e fortemente dobrada.

Os defeitos de cauda são, em sua maioria, considerados como expressão de uma disfunção epididimária, fato constatado retirando-se espermatozóides de diferentes pontos do epidídimo, onde se verificou uma progressiva diminuição no percentual de dobramentos de cauda (RAO, 1971).

As modificações funcionais que ocorrem durante o trânsito dos espermatozóides pelo epidídimo implicam na maturação de várias e diferentes organelas celulares, com modificação progressiva da flexibilidade do flagelo e uma progressiva perda de água através das diferentes concentrações de osmolaridade do trajeto epididimário (HAFEZ, 1995).

As glândulas secretoras do epidídimo fazem grande liberação de Fósforo e Potássio, aumentando a osmolaridade do meio e sua deficiência

pode levar tanto a patologias de ordem primária quanto secundária (ZÜGE *et al.*, 2001).

2.4.6. Defeitos de acrossoma

A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma, uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os últimos estágios da formação do espermatozóide (RAO, 1971). Esta estrutura semelhante a um capuchão contém várias enzimas hidrolíticas incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, envolvidas no processo de fertilização (HAFEZ, 1995). O segmento equatorial do acrossoma é importante porque é esta parte do espermatozóide, que juntamente com a porção anterior da região pós-acrossômica que inicialmente funde-se com a membrana do oócito durante a fertilização (BARTH&OKO, 1989).

O acrossoma pode apresentar-se enrugado ou com contorno defeituoso ou, ainda estar destacado (RAO, 1971).

A destruição do acrossoma bem como suas lesões podem ser causadas por envelhecimento, choque térmico ou por manipulação indevida do sêmen durante seu processamento, abstinência prolongada e patologias de caráter hereditário como defeito de “knobbed” (MIES FILHO, 1987).

O acrossoma pode também sofrer alterações devido ao congelamento e descongelamento em processo de inseminação artificial (BALIEIRO, 1993).

3. Materiais e Métodos

3.1. Local do experimento

O experimento foi conduzido no período de julho a dezembro de 2004, na Universidade Estadual Paulista, Fazenda Experimental Presidente Médici, FMVZ- UNESP- Campus do Lajeado, Centro de bubalinocultura, município de Botucatu (Latitude 22°52'20''S, Longitude 48°26'37''W).

3.2. Animais

Três meses antes do início do experimento cinco animais, da raça Murrah, com idade de dois a sete anos, retirados de regime criação extensivo, foram condicionados a condução em cabresto e colheita com vagina artificial modelo Botucatu. Dos cinco animais treinados apenas um foi eliminado por não adaptar-se ao manejo. Os quatro búfalos tiveram de ser submetidos a sucessivas colheitas com a finalidade de retirar os animais do quadro de abstinência sexual em que se encontravam, sendo este quadro deletério a qualidade do sêmen. Três animais foram mantidos em piquete do confinamento e um no piquete do centro de bubalinocultura.

3.2.1. Alimentação

Os três animais que encontravam-se no confinamento foram alimentados com forragem, silagem de sorgo e milho, concentrado comercial para engorda, sal mineral “ad libitum” e ração dos animais do confinamento em função do manejo da fazenda.

O animal que encontrava-se no centro de bubalinocultura era alimentada apenas com silagem de sorgo, cana picada e sal mineral “ad libitum”.

3.3. Colheita do sêmen

Quatro animais foram submetidos a regime de três colheitas semanais e antes de cada colheita, realizou-se uma falsa monta para melhorar a qualidade do sêmen, foi aproveitado apenas o primeiro ejaculado. Para colheita utilizou-se como manequim fêmea da mesma espécie em estro induzido através da administração de análogo sintético de prostaglandina D-cloprostenol Ciosin[®] e Cipionato de Estradiol - ECP[®].

A vagina artificial utilizada para colheita de sêmen foi a modelo Botucatu com temperatura entre 42 a 46°C, preconizada por Vale *et al.* (1984); Vale, (1994).

3.4. Análise do ejaculado

O ejaculado teve seu volume aferido em tudo de ensaio graduado, a seguir verificou-se cor e aspecto e após estas análises iniciais o sêmen a fresco foi avaliado em gota sobre lâmina, para verificar o movimento de massa dos espermatozóides (turbilhão 0-5) em microscópio (Taimin TM 18A) com objetiva de aumento de 10X. O vigor (0-5) e o percentual de motilidade progressiva foi observado em lâmina com lamínula, sendo estas análises realizadas no sêmen a fresco e após descongelação, com exceção do turbilhonamento realizado apenas no sêmen a fresco. Paralelamente, foram depositados 10 μ L de sêmen em 2 mL de solução de formol salino tamponado, conforme fórmula abaixo, para verificação do percentual de patologias espermáticas; alteração de acrossôma e patologias de cauda. Foram quantificadas 200 células em microscópio de contraste de fase, marca Olympus BX40, em objetiva de imersão com aumento 100X, segundo metodologia de Hancock (1957).

Formol salino tamponado 2,9% (EMBRAPA, 2005)

Formula para 100mL de solução

Citrato de sódio 2,9%. (ECIBRA 1669).....	96mL
Formol 10%(comercial).....	4mL

3.5. Preparação dos gradientes de Percoll

Para preparação dos diferentes gradientes de Percoll foi seguida a metodologia de Hossepian (1998), 11 partes de Percoll em uma parte de NaCl 1,5M, contendo 5,55mM de glicose, 2mM de HEPES e 10 μ g kanamicina/mL, para preparação de solução stock, adicionado diferentes proporções de meio Hank's, com as modificações a seguir.

A solução stock de Percoll foi preparada na proporção de 1:11 com 1 parte de Percoll (Amersham Biosciences 17-0891-01) em 11 partes de solução contendo KCl 1M (Ecibra – 1233), NaH₂PO₄ 0,1M (Sigma – 229903-

10G), NaCl 1,5M (Merck 21635) e HEPES sódico 23,8 μ g/mL(Sigma - H7006/100). Para preparação dos nove diferentes gradientes de Percoll adicionou-se a solução stock Solução A do diluente glicina-gema (Quadro 2) nas seguintes proporções: 90, 80, 72, 65, 57, 49, 42, 34, 25 % com densidade de 1,06; 1,05; 1,04; 1,03; 1,02; 1,01; 1,00 e 0,9 g/mL, respectivamente.

Quadro 2 - Solução A - Solução A do diluente de sêmen Glicina-Gema

Para 1000mL de solução

Glicose (Vetec - 221).....	6g
D(-)Frutose (Mikrobiologie – 5323).....	6g
Citrato de sódio (ECIBRA – 1669).....	10g
Glicina (Merck – 4201).....	4,7g
Estreptomicina (Sigma P40-3).....	1g
Penicilina G.....	0,33g

Filtrada em papel filtro, Chacur(1996)

Logo após a colheita sêmen foi retirada uma alíquota de 0,7mL do sêmen que foi depositada sobre 2mL de Percoll 80% contidos em tubo de ensaio cônico, esquematizado na figura 1 para lavagem dos espermatozóides, conforme metodologia de Hossepian (1998) da qual foi modificada a força de centrifugação de 250xg por 30minutos para 200xg por 10 minutos. O precipitado foi colhido com auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocado sobre os nove gradientes, acondicionados em tubo de ensaio cônico, sendo 0,7mL de cada gradiente dispostos do mais denso para o menos denso, como esquematizado na Figura 1.

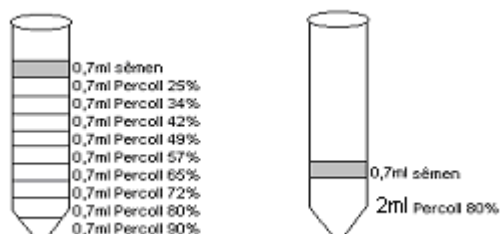


Figura 1 - Tubo de ensaio cônico com os gradientes de Percoll

Os gradientes de Percoll foram depositados de acordo com a metodologia de Hossepian (1998) na qual a força de centrifugação de 250g por

30 minutos passou para 100g por 30 minutos. O precipitado foi colhido com auxílio de uma pipeta de Pasteur, ressaltando que o sêmen tratado foi lavado em diluente TES, preparado como demonstrado a seguir, através de centrifugação a 500g por 10 minutos, colhendo-se o precipitado e suspenso em solução TES(Quadro 3) para congelação. Já na metodologia de Hossepián (1998) não foi realizada esta diluição.

Todas as centrifugações foram feitas em centrífuga de rotor horizontal Fanem a temperatura ambiente.

Quadro 3 - Diluente TES 1000mL

Solução A (500mL)	Solução B (500mL)
Tes (Merck 8320).....24,5g	Leite Desnatado 11%.....230mL
TRIS base Trizima® (Sigma T6066).....5,3g	Gema de ovo.....200mL
D(-)frutose (Mikrobiologie – 5323).....1,08g	Glicerol 87% (Merck 4094)..70mL
Estreptomicina(Sigma P40-3).....700mg	Solução final= Sol A + Sol B
Penicilina G.....70mg	

Vale *at al.* (1984)

3.6. Congelação do sêmen

O sêmen colhido e diluído em diluente TES serviu de controle. O sêmen tratado com centrifugação nos gradientes de Percoll e o controle foram identificados, envasados em palhetas de 0,5 mL e resfriados a 4° C por duas horas em geladeira, com uma curva de resfriamento de 0,25 °C por minuto.

O sêmen envasado foi congelado em caixa isotérmica contendo 5 cm de nitrogênio líquido, onde as doses foram acondicionadas em grade de congelação, que posicionava as doses 5 cm acima da coluna líquida de nitrogênio a uma temperatura de 120°C negativos permanecendo por 20 minutos, sendo em seguida imersa no nitrogênio líquido a 196°C negativos, contido na própria caixa isotérmica e posteriormente acondicionados em container criogênico a 196°C negativos.

3.7. Avaliação pós-descongelção

Para descongelção das palhetas, estas foram imersas em água a 40°C por 30 segundos (RIBEIRO *et al.*, 1991) e avaliadas quanto a motilidade, vigor e percentual de patologias espermáticas.

3.8. Espermatozoides normais e anormais

A cada partida foi realizado o exame de patologias espermáticas, para o sêmen tratado e controle, como descrito no item 4.3.

3.9. Avaliação da integridade de membrana

Foram analisadas as integridades de membrana apenas das doses que apresentaram boa congelação, através de coloração fluorescente de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio conforme técnica de Harrison and Vickers (1990) modificada por Zúccari (1998), depositando-se em 40µL de solução de Corboxifluoresceína e Iodeto de Propídio, preparada conforme formula abaixo, 10µL do sêmen a ser analisado. Esta mistura foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e analisados em microscópio de fluorescência (Leica DMLB) com objetiva de 40x, Filtro I3. Foram contadas 200 células divididas em membrana lesada (vermelha ou vermelha e verde) e integra (verde) conforme figura 3.

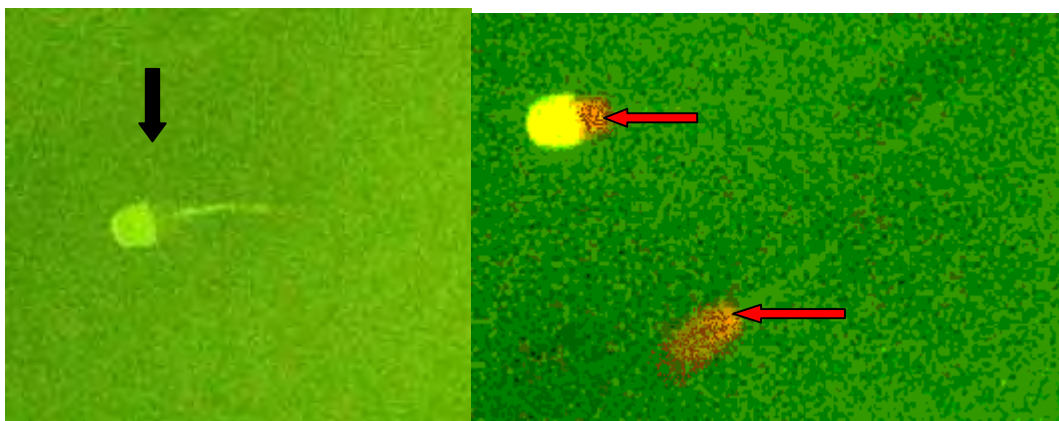


Figura 2 – Espermatozóide corado com Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio para determinação de integridade de membrana onde os espermatozóides lesados estão indicados por setas vermelhas e íntegros por seta preta.

Quadro 4: Formula da Solução de Iodeto de propídio e Carboxifluoresceína

Formula para 1 mL de solução trabalho	
Citrato de sódio 3%.....	960µL
Formaldeído 10%.....	10µL
Iodeto de Propídio.....	10µL
Carboxifluoresceína.....	20µL
Solução de Iodeto de Propídio e carboxifluoresceína	

3.10. Avaliação da presença de Corpúsculo-F

Esta técnica foi utilizada para verificação da precisão da separação através da centrifugação em nove gradientes de Percoll. Após a descongelação, 0,1mL do sêmen foi acrescido do mesmo volume de Dispase 2000 P.U. /mL (Protease; 1,2unid/mg extraída e purificada do *Bacillus Plymixa* – Sigma P6141), incubando-se esta mistura à 37°C por 10 a 30 minutos. Após a incubação adicionou-se 0,1 mL de quinacrina mostarda (Sigma Q2876) a 0,05mg/mL. Esta segunda mistura foi colocada em microtúbulos e agitados por 60 a 90 minutos a temperatura ambiente em agitador (Kline) a 40 rpm. Em seguida o material foi depositado em lâmina sobre por lamínula, e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DMLB) com objetiva de 40x e analisador digital de imagem (Leica DC 300F 0,63x) e filtro I3, onde foram

aferidas 200 células e verificado o percentual de células com Corpúsculo-F, conforme técnica de Ogawa *et al.*(1988), com aumento no tempo de incubação de 10 minutos em protease para 30 minutos e o tempo de incubação em quinacrina de 60 minutos para 90 minutos.

3.11. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística de média, desvio padrão e variância e Teste T de Student com análise bi-caudal e teste tipo 3 para diferença desigual de duas amostras, através do programa Microsoft Excel do Office 2000.

4. Resultados e Discussão

4.1. Vigor

Os búfalos apresentaram médias de $3,00 \pm 0,80$; $2,30 \pm 1,10$ e $1,30 \pm 1,40$ respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado onde o sêmen a fresco não diferiu do controle, já o tratado apresentou inferior ao controle ($P < 0,01$) (Tabela 1). Médias semelhantes foram encontradas por Balieiro (1993); Chacur (1996) e Náhum (2001) para sêmen a fresco e inferiores as obtidas por Vale *et al.* (1984) e Oba *et al.* (1993) para sêmen congelado.

Dos quatro animais estudados, apenas um apresentava boa congelação como observado no Gráfico 1 e 2. Fato este associado a diferente dieta administrada a este animal, com silagem de sorgo e os demais como silagem de sorgo e milho, e restos de ração do confinamento, devido ao manejo da fazenda. Posteriormente verificou-se que esta continha farelo de algodão, sendo a provável causa da queda na qualidade do sêmen destes animais .

Os valores médios de vigor, das partidas do animal que apresentou boa congelação foram de $3,00 \pm 0,70$; $2,20 \pm 0,40$ e $3,00 \pm 0,70$, respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado, sendo os valores significativamente semelhantes entre si ($P > 0,05$), e o sêmen a fresco igual ao tratado ($P=1$) como observado na tabela 3, resultado estes semelhantes aos verificados por Vale *et al.* (1984) e Oba *et al.* (1993) em sêmen congelado com vigor médio igual três.

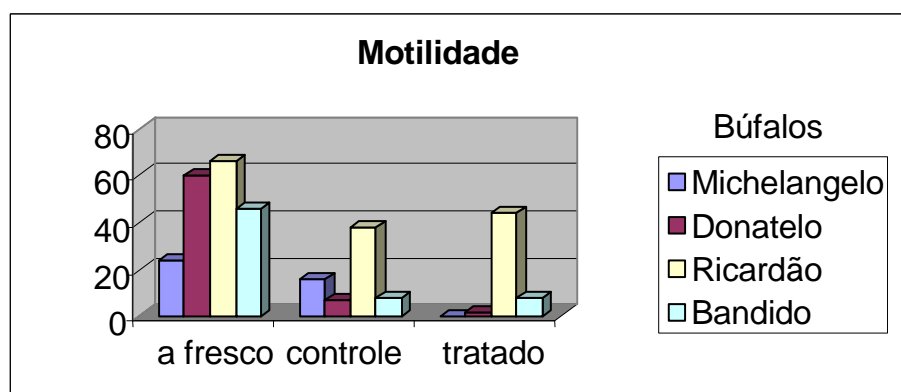


Gráfico 1 - Valores médios de motilidade(%) do sêmen a fresco, controle e tratado de búfalos.

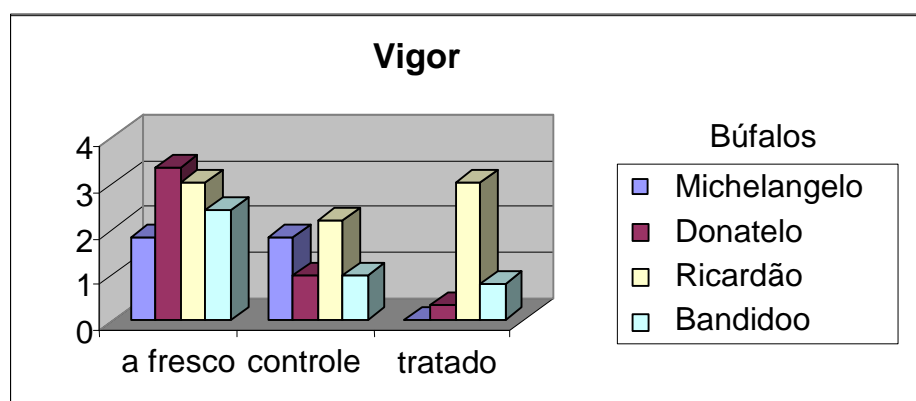


Gráfico 2- Valores médios de vigor (0-5) do sêmen de a fresco controle e tratado de búfalos.

Tabela 1 – Valores médios do vigor e motilidade(%) do sêmen de búfalos nos grupos a fresco, controle e tratado.

Grupo de animais	Sêmen		
	a Fresco	Controle	Tratado
Motilidade	57,30±18,50	20,00±17,30	17,60±25,50
Vigor	3,06±0,80 ^a	2,33±1,10 ^a	1,33±1,40 ^a
Animais de boa congelação			
Motilidade	66,00±11,40 ^a	38,00±17,80 ^a	44,00±27,90 ^a
Vigor	3,00±0,70	2,20±0,40	3,00±0,70

^a resultados na mesma linha estatisticamente diferentes p<0,05

4.2. Motilidade

O sêmen de búfalo apresentou percentuais médios de motilidade de $57,30 \pm 18,60\%$; $20,00 \pm 17,30\%$ e $17,30 \pm 25,50\%$, respectivamente, para os grupos a fresco, controle e tratado, onde o sêmen a fresco apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Garcia & Pinto (1991) e Amstalden *et al.* (1993). Contudo inferiores as obtidas por Balieiro (1993), Alexiev *et al.* (1994) Misra *et al.* (1994), Dhami *et al.* (1994), Fritsch (1994), Chacur (1996), e Vale *et al.* (1997; 1999). Já os grupos controle e tratado diferiram significativamente ($P < 0,05$) do sêmen a fresco, mas sem diferirem entre si (Tabela 1) As médias foram inferiores as de Vale *et al.* (1984), Ohashi (1993), Nahún (2001), Oba *et al.* (1993) Balieiro (1993), Fritsch (1994) e Chacur (1996) em sêmen congelado.

O animal com sêmen de boa congelação apresentou médias de motilidade do sêmen de $66,00 \pm 11,00\%$; $38,00 \pm 17,80\%$ e $44,00 \pm 27,90\%$, respectivamente, no sêmen a fresco, controle e tratado. A média do sêmen a fresco diferiu do controle e do tratado ($P > 0,01$), sendo que o controle e o tratado diferiram entre si ($P < 0,05$). A média para sêmen a fresco foi semelhante as de Garcia & Pinto (1991), Amstalden *et al.* (1993), Alexiev *et al.* (1994), Misra *et al.* (1994) e Vale *et al.* (1997; 1999), inferiores as obtidas por Balieiro (1993), Dhami *et al.* (1994), Fritsch (1994) e Chacur (1996). Já no tratado e controle as médias de motilidade foram semelhantes as de Vale *et al.* (1984) e superiores as de Ohashi (1993), Nahún (2001), Oba *et al.* (1993) e Balieiro (1993) e inferiores as de Fritsch (1994) e Chacur (1996) para sêmen congelado.

4.3. Patologias

4.3.1. Cauda fortemente dobrada

O sêmen dos animais apresentaram médias percentuais de patologias de cauda fortemente dobrada de $23,10 \pm 30,40\%$; $29,20 \pm 21,50\%$ e $17,80 \pm 23,90\%$, respectivamente, para os grupos a fresco, controle e tratado, não foi verificado diferença estatística entre as médias, como observado na Tabela 2.

Quando comparamos os resultados do animal que possuía sêmen de boa congelação, notou-se médias de cauda fortemente dobrada de $7,00\pm 3,00\%$; $33,80\pm 24,00\%$ e $10,00\pm 12,00\%$, respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado. O sêmen do grupo tratado sofreu redução nos percentuais de cauda fortemente dobrada, resultado este semelhante ao grupo de sêmen a fresco. O que leva a concluir que a centrifugação em nove gradientes de Percoll selecionou o sêmen com espermatozoides com menor número de cauda fortemente dobrada como observado por Parrish *et al.*(1995). Sendo portanto viável tanto para produção de dose para inseminação artificial como para FIV.

Tabela 2 – Percentuais de patologia de cauda fortemente dobrada e cauda dobrada no sêmen a fresco, controle e tratado de búfalos.

Grupo de Animais	Sêmen		
	a fresco	Controle	Tratado
Cauda Fortemente dobrada	23,10±30,00	29,20±21,00	17,80±23,00
Cauda Dobrada	9,80±6,60 ^{a,b}	5,64±4,00 ^{a,b}	7,82±13,00
Sêmen dos animais de boa congelação			
Cauda Fortemente dobrada	7,00±3,00 ^{a,b}	33,80±24,00 ^{a,b}	10,00±12,00 ^{a,b}
Cauda Dobrada	13,40±7,20 ^{a,b}	4,00±4,00 ^{a,b}	4,40±7,10 ^{a,b}

^{a,b} Valores estatisticamente diferentes $p < 0,05$

4.3.2. Cauda dobrada

Os animais apresentaram sêmen com percentual de cauda dobrada de $9,80\pm 6,60\%$; $5,64\pm 4,00\%$ e $7,82\pm 13,00\%$, respectivamente, para o sêmen a fresco tratado e controle, onde o sêmen tratado não diferiu do controle e do a fresco. Já, para patologia de cauda dobrada do animal com sêmen de boa congelação, foi verificado percentuais médios de $13,40\pm 7,20\%$; $4,00\pm 4,00\%$ e $4,40\pm 7,10\%$, respectivamente, para sêmen a fresco, controle e tratado, indicando que o Percoll melhorou o percentual de cauda dobrada quando comparado ao sêmen a fresco sem diferir do controle. Isto pode indicar que a osmolaridade do diluente TES e do Percoll melhoraram a osmolaridade do sêmen a fresco, fato este demonstrado pela redução do percentual de caudas dobradas como observado por Rao (1971).

4.3.3. Defeito de peça intermediária

O sêmen de búfalo mostrou médias percentuais de defeitos de peça intermediária de $2,00 \pm 1,80\%$; $1,50 \pm 1,60\%$ e $2,50 \pm 3,30\%$, respectivamente, para sêmen a fresco, controle e tratado, não havendo diferença entre os grupos.

Quando comparados com o sêmen de boa congelação, este apresentou-se semelhante ao sêmen de baixa congelação, demonstrando médias de $1,00 \pm 1,40\%$; $0,60 \pm 1,30\%$ e $1,40 \pm 1,50\%$, respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado. Defeitos de Peça Intermediária (PI) podem ser ocasionados pelo processamento de centrifugação e congelação segundo Rao *et al.*(1995).

No experimento não foi verificada diferença estatística dessas patologias.

4.3.4. Defeito de acrossôma

Neste trabalho os grupos a fresco, controle e tratado, demonstraram médias de alteração de acrossôma de $0,70 \pm 0,90\%$; $1,00 \pm 2,00\%$ e $20,90 \pm 14,60\%$, respectivamente, como ilustrado na Tabela 3. O aumento de defeitos de acrossôma no sêmen tratado foi superior ao do sêmen fresco e controle. Os defeitos de acrossôma do animal com sêmen de boa congelação, mostraram médias de $0,60 \pm 0,80\%$; $0,20 \pm 0,40\%$ e $16,20 \pm 9,70\%$, respectivamente, para sêmen a fresco, controle e tratado. O sêmen tratado diferiu do a fresco e do controle, resultados estes inferiores aos citados por Ramalho *et al.* (2000) que descreveu percentuais de defeitos de acrossôma maiores no sêmen congelado que no sêmen sexado.

4.3.5. Desprendimento do acrossôma

As médias de desprendimento de acrossôma foram de $0,80 \pm 1,50\%$; $1,10 \pm 2,20\%$ e $6,80 \pm 6,40\%$, respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado, como descrito na Tabela 3. O sêmen tratado diferiu tanto do sêmen a fresco quanto ao controle. Já, as médias de desprendimento de acrossôma do

animal com sêmen de boa congelação foram de $1,00\pm 1,70\%$; $2,00\pm 3,30\%$ e $5,00\pm 5,40\%$, respectivamente, para o sêmen a fresco, controle e tratado. O sêmen tratado diferiu do a fresco porem não apresentou diferença do controle. Valores semelhantes aos obtidos por Ramalho *et al.* (2000). A principal alteração observada foi a reação acrossômica prematura, assim como descrito por Parrish *et al.*(1995) o que torna o sêmen sexado por centrifugação em gradientes de Percoll ideal para emprego em técnica de FIV.

Tabela 3 – Percentuais de defeitos de acrossôma(%) no sêmen a fresco, controle e tratado de búfalos.

Grupo de Animais	Sêmen		
	Fresco	Controle	Tratado
Defeito de acrossôma	$0,70\pm 0,90^{a,b}$	$1,00\pm 2,00^{a,b}$	$20,90\pm 14,00^{a,b}$
Desprendimento de acrossôma	$0,80\pm 1,50^{a,b}$	$1,10\pm 2,20^{a,b}$	$6,80\pm 6,40^{a,b}$
Animal com sêmen de boa congelação			
Defeito de acrossôma	$0,60\pm 0,80^{a,b}$	$0,20\pm 0,40^{a,b}$	$16,20\pm 9,70^{a,b}$
Desprendimento de acrossôma	$1,00\pm 1,70^{a,b}$	$2,00\pm 3,30$	$5,00\pm 5,40^{a,b}$

^{a,b}Valores diferem estatisticamente, $p < 0,05$

4.3.6. Integridade de membrana

O teste de integridade de membrana, realizado apenas no animal com sêmen de boa congelação, demonstrou que o sêmen controle mostrou média de espermatozóides íntegros de $31,5\pm 17\%$ e o tratado de $36,3\pm 11\%$, sem variação significativa entre os dois grupos, indicando que a centrifugação em diferentes gradientes de Percoll, não afetou a integridade da membrana espermática.

4.4. Avaliação da presença de Corpúsculo-F

A técnica de identificação do corpúsculo-F através da coloração com quinacrina mostarda foi a mais utilizada para validação de resultados de métodos de sexagem de espermatozóides, antes do aprimoramento da técnica de citometria de fluxo.

Em búfalos o padrão de fluorescência observado foi um ponto fluorescente na base da cabeça do espermatozóide com tempo de incubação

semelhantes aos descritos por Ogawa *et al.*(1988). Já, na técnica modificada com aumento nos tempos de incubação foi verificada modificação no padrão de fluorescência, passando de um ponto fluorescente na base da cabeça do espermatozóide, como demonstrado na figura 4, para um espermatozóide completamente corado, como observado na figura 3, sem alterações no percentual de espermatozóides corados.

O percentual de espermatozóides com presença do Corpúsculo-F foram de $58,7 \pm 5,4$ no grupo controle e $41,2 \pm 5,4$ no tratado, onde os grupos foram diferentes entre si ($p < 0,01$), com um aumento médio de 17,5% de espermatozóides portadores do cromossomo X. Resultado semelhante ao obtido por Hossepian (1998) com observação de corpúsculo-F e inferior ao obtido por Ramalho *et al.* (2000) com inseminação e posterior sexagem ultrassonográfica. Ambos trabalharam com sedimentação em nove gradientes de Percoll.

Para reduzir a margem de erro foi utilizado neste experimento o grupo controle. A diferença se deve a margem de erro de 16,4% descrita por Blottner *et al.* (1992).

Novos estudos devem ser conduzidos para aferir, de forma mais precisa a acurácia da sedimentação em nove gradientes de Percoll com técnicas mais precisas como reação de polimerase em cadeia (PCR), IA com sexagem ultrassonográfica ou PCR em embriões de FIV com sêmen sexado técnicas essa que não foram utilizadas devido ao alto custo.



Figura 3 – Espermatozóides com 30 minutos de incubação em Protease e 90 minutos em quinacrina, onde espermatozóide com seta indica portador do corpúsculo-F e sem seta sem corpúsculo-F conforme técnica de Ogawa *et al.*(1988) modificada.



Figura 4 - Espermatozoides com incubação de 10 minutos em protease e 60 minutos em quinacrina mostarda, onde a seta branca indica o espermatozói­de sem Corpúsculo-F e vermelha espermatozoides com a presença do Corpúsculo-F.

5. Conclusão

- A centrifugação de sêmen em nove gradientes de Percoll não interferiu na motilidade, na integridade de membrana, defeitos de peça intermediária e cauda.
- A centrifugação do sêmen com nove gradientes de Percoll, levou ao aumento significativo de alterações de acrossôma, aumento do vigor e redução no percentual de caudas fortemente dobradas e redução no percentual de patologias de cauda fortemente dobrada.
- A centrifugação em nove gradientes de Percoll foi eficiente no enriquecimento de sêmen com população maior média de 17,5% mais X de espermatozoides portadores do cromossomo X quando comparado ao controle.

6. Referências bibliográficas

ALEXIEV, A.I.; KOVEL,S.I.;DANEY, A.D.;STOJANOVA,M. Characteristics of buffalo bulls sperm production in Bulagaria. **WORLD BUFALO CONGRESS, 4.,** 27 A 30 DE JUNHO DE 1994, São Paulo, V.3 p 492

Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos **ABCB** <http://www.abcb.com.br/>
Acesso em 25 jul. 2002.

ALI, J.I. Separation of bovine X from Y chromosome bearing spermatozoa using monoclonal H-Y antibodies. **Diss Abstr. Int.,** v.47, p. 2689-B, 1987

AMSTALDEN, M.; OBA, E.; SANTOS, J.E.P.; RAMOS, A.A.;FRANZ,L.C.;CHACUR,M.G.M. Estudo parcial das características quantitativas e qualitativas do sêmen bubalino. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,** 10, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.2, p335, 1993

AMMAN, R.P. Treatment of sperm to predetermine sex. **Theriogenology,** Stoneham, v.31, n. 1, p.49-60, 1989

BALIERO, K.R. DE C. **Efeitos dos diluidores e das temperaturas de descongelamento sobre a motilidade progressiva e integridade acrossômica de espermatozoides de búfalos Murrah(*Bubalus bubalis*).** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1993, Dissertação de Mestrado. 47p.

BATTACHARYA, B.C; SHORE, P.; GUNTHER, A.H.; BERT, M.E. Successful Separation of X and Y Spermatozoa in Human and Bull Semen, **Int. J. Fertil.** v.22, p.30-5, 1977

BEAL, W.E.; WHITE, L.M. GARNER, D.L. Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumine gradient. . **Anim. Sci.**, v.58, p. 1432-6, 1984

BECK, K.J.;HERSCHEL,S.; HUNGERSHOFER,R.;EBERHARD SCHWINGER, M.D. The effect of steroid hormones on motility and selective migration of X and Y bearing human spermatozoa. **Fertil. Esteril.**, Birmingham, v.27, n.4, p.407-12, 1976

BENNET, K.J.; BOYSE, E.A. Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. **Nature**, London, v.246, p.308-9, 1973

BLOTTNER,S.; NEHRING, H.; JENECHEN, W. ; PETER,W., **Archiv Exp. Veterinarmedizin**, v.37, p.641-55, 1983.

BLOTTNER,S.; PITRA, C. And BERGER, U Ychromosome specific fluorescence (F-body) of poorly decondensed bovine spermatozoa. **Andrologia**, v.24, p.255-9, 1992.

BHOSREKAR, M.R.; MOKASHI, S.P.; PUROHIT, J.R.; GOKHALE, S.B.; MANGURKAR,B.R. Glycerolization and equilibration produces on quality of frozen buffalo semen. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.63, n.9, p.936-941. 1993

BRADLEY, M.P. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. **J.Dairy Sci.**, v.72, p.3372-80, 1989

CAMARÃO, A.P.;LOURENÇO-JUNIOR,J.B.; DUTRA,S. **Flooded pasture production for grazing buffalo in the brazilian Amazon Region** 1º Simpósio de Búfalo das Américas 02 à 07 de setembro de 2002, pg. 68-82 Belém-PA

CHACUR, M.G.M. **Avaliação da congelação de sêmen bubalino (*Buballus bubalis*) com diferentes diluidores Glicina-gema, Triladyl e TES em diferentes tempos de equilíbrio.** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, 1996, Dissertação de Mestrado. 116p.

CRAN, R.B.; JOHNSON, L.A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Vet. Rec.**, v. 136, p.495-6, 1995

CRIBU, R.G.; POPESCO, C. **Proc. 2nd europ. Collq. Cytogenetics**, Giessen, p. 204-11, 1975

DAYAN, A. **Seleção do sexo em mamíferos domésticos**, Instituto de Ciências e Saúde da Universidade Paulista (UNIP), Jaboticabal, 1994, Monografia de conclusão de curso

DHAMI, A.J.; JANI, V.R.; MOHAN, G.; SAHNE, K.L. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. **Buffalo Journal**.v.1, p.35-45. 1994

DIONISIO, R.B.; GLASS, R.H. Effects of pH on the migration of X and Y sperm **Fertil. Steril.**, v.22, p.303, 1972

DOWING, D.C.; BLACK, D.L. Equality in survival of X and Y chromosome-bearing human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v.27, p.1191-3, 1976

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **EMBRAPA**
<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações/doc/doc51/08anexos82.html>. Acesso em 26 jul. 2005

EMMENS, C.W. Insemination pH and sex ratio in rabbits. **J. Hered.**, v. 51, p. 156-157, 1960

ENGELMANN, U.; KRASSNIG, F.; SCHATZ, H. Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow eletroforesis. **Gamete Res.**, v.19, p.151-9, 1988

ERICKSSON, R.J.; LANGEVIN, C.N.; NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, Londom, v.246, p.241-4, 1973

ERICKSSON, R.P.; LEWIS, S.E.; BUTTLEY, M. Is haploid gene expression possible for sperm antigen? **J. Reprod. Immunol.**, v.3, p.195-217, 1981

EVANS, J.M.; DOUGLAS, T.A.; RENTON, J.P. An attempt to separate fractiond rich in human Y sperm. **Nature**. Londom, v.253, p. 352-4, 1975

FAO (Food and Agriculture Organization) FAOSTAT data <http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>. Acesso em 10 de ago. 2005.

FRITSCH, M. **Eficiência de dois diluidores e três tempos de equilíbrio na congelação de sêmen bubalino**. Santa Maria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994, Dissertação de Mestrado. 103 p.

GARCIA, O.S. & PINTO, E.H.C.C. Aspectos físicos e morfológicos do sêmen do búfalo e sua criopreservação. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 9, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.2, p.60-65, 1991

GORDON, M.J. Control of sex ratio in rabbits by eletrophoresis of spermatozoa. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.43, p.913-8, 1957

GOLDBERG,H.E.; BOYSE,E.A. and BENNET,D. Serological demonstration of H-Y(male) antigen on mouse sperm. **Nature**, London, v. 232, p. 478-80, 1971

HAFEZ, B. & HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals 7th ed.** Lippincott Williams &Wilkins, 1997

HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p.1295-1307, 1999

HOPPE, P.C.; KOO, G.C. Reating mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized" *in vitro*"n **J. Reprod. Imunnol.**, v.6, p.1-9, 1984

HOSSEPIAN, V.F.L. **Seleção do sexo em espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade**, 1998 Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética) Universidade de São Paulo (USP)-São Paulo.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **J. Roy. Microsc. Soc.**, v. 76, p. 84-97, 1957.

HARRISON, R.A. and VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses menbrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88, p. 343-52, 1990.

HUBNER, H.; RAULUSZKIEW, S.; SYSA, P. **Acta. Vet. Brno.**, v. 41, p. 351-354, 1970

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) <http://www.sidra.ibge.gov.br/dba/tabela/>. Acesso em 10 de ago. 2005.

ISHIJIMA, S.A.; OKUNO, M.; MOHRI, H. Zeta potential of human X-and Y-bearing sperm. **Int. J. Androl.**, v.14, p.340-7, 1991

JOHNSON, L.A.; PINKEL, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa **Cytometry**, v. 7, p. 268-73, 1986

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M.V. Flow cytometry of X and E chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with HOECHST 33343. **Gamete Res.**, v. 17, p.203-12, 1987

JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P., HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biol. Reprod.**, v. 41, p.199-203, 1989

JOHNSON, L.A.; CLARKE, R.N. Sperm DNA and sex chromosome differences between two geographical populations of the creeping vole, *Microtus oregoni* **Mol. Repro. Dev.**, v.27, p. 159-62, 1990

JOHNSON, L.A. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X and Y-bearing sperm. **Reprod. Dom. Anim.**, v.26, p. 309 -14, 1991

JOHNSON, L.A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm. **J. Anim. Sci.**, v.70(Suppl.2) p. 8-18, 1992

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxford Rev. Reprod. Biol.**, v.16, p. 303-26, 1994

JOHNSON, L.A. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.893-903, 1995

JOHNSON, L.A. and WELCH, G.R. Sex Preselection: High-Speed Flow Cytometric Sorting of X and Y Sperm for Maximum Efficiency. **Theriogenology** . V. 52, n. 8,p. 1323-41, 1999

KANECO, S.; OSHIO,S. KOGAYASHI, T., LIZUKA, R. and MOHRI, H. Human X- and Y- bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** V.124, p. 950-955 ,1984

KANECO, S., *et al.* Separation of human X- and Y bearing sperm using Percoll density gradient centrifugation. **Fertil. Steril.**, v. 40, n.8, p.661-5,1983

KLEEGMAN, S.J. Can sex be predetermined by the physician? **Excerpta Med.**, v.109, p.109, 1966

KNAACK,J., NEHRING, H., LORENZ, G. New result of experimental Sex control in cattle. **Tierzucht**, v.7, n.4, p.156-9, 1973

KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E. A.HAMMERLING, U. AND LARDIS, M.P., Topographicla, localisation of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Proc. Natn. Acad. Sci.**, v. 70, p. 1502-5 (1973)

MADAN, M.L. et al. Buffalo endocrinology with special reference to embryo transfer. **Embryo Biotechnology Center**, karnal, p. 84,1993

MANIK,R.S. & MUDGAL,V.D. Variation in physico-chemical and biochemical attributes of buffalo semen. **Word Review of Animal Production**. V. 20, n. 4, 45-51, 1984

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais** . 6 ed. v. 2, Sulina, Porto Alegre, 1987

MISRA, A.K.; PATEL,S.H.; JOSSHI,B.V.; JAISWAL, R.S.; TRIVEDI,K.R. Buffalo semen characteristics and its freezability under indian conditions. **WORLD BUFFALO CONGRESS, 4**, São Paulo, 1994, v.3, p.495-497

MOHAN,G &SAHNI,K.L. Comparative effecacy of certain extenders containing varios levels of yolk for preservation of buffalo semen at 5°C. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.61, n.7, p 725-727, 1991

MOREIRA-FILHO,C.A., HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Utilização de Sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade para inseminação artificial de novilhas da raça Holandesa. In: **Arq. Fac. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n.1, 2000.(Suple) (Doc.6.3.28)

MORELL, J. M. Application of flow cytometry to artificaial insemination: a review. **Vet. Rec.**, v.129, p.375-8, 1991

MORUZZI, J.F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromossome-bearing spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, p.319-23, 1979

MUDD, S.; MUDD, E.B.H. The specificity of mammalian spermatozoa, with special reference to eletrophoresis as a means of serological differentiation. **J. Immunol.**, v.17, p.39-52, 1929

MUEHLEIS, P.M.; LONG, S.Y. The effect of altering the pH seminal fluid on the sex ratio of rabbit offspring. **Fertil. Steril.**, v.27, p.1438-45, 1976

NEVO, A.C., MICHAELI, I., SCHINDLER, H. Eletroforetic properties of bull and of rabbit spermatozoa. **Exp. Cell Res.**, v. 23, p. 69-83, 1961

NAHÚN, B. de S. **Uso de água de cocô (*Cocus nucifera*) como diluidor para criopreservação de sêmen de bubalino**, Belém.PA: Universidade Federal do Pará, 2001, Dissertação de Mestrado.

NICHOLAS, F.W.; SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Animal Production**, v. 36, p. 341-53, 1983

OBA, E.; FUCK, E.J.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O.; OHASHI, O.M. Estudo preliminar de diferentes meios para congelação de sêmen de búfalos. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 10, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, v.2, p.337

OGAWA, S. et al Are fluorescent bodies of Y-spermatozoa detectable in common with mammalian species **Theriogenology**, v. 239, n. 5, p. 1083-89, 1988.

OHASHI, O.M.; SOUZA, J.S.; VALE, W.G. Aspecto reprodutivo do macho bubalino In : **Bubalinos, fisiologia e patologia da reprodução**. Campinas: Fundação Cargill, p. 69-80, 1988.

OHASHI, O.M. **Inseminação Artificial em Búfalos. Aspectos gerais e perspectivas de sua utilização no Brasil. Sanidade e Produtividade em búfalos**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. P. 111-120.

OHNO, S.; JAINCHIL, J.; STENIUS, . The creeping vole as a gonossonic mosaic, the OY/XY construction in the male. **Cytogenetics**, v.2, p. 232-9, 1963.

OHNO, S.; WACHTEL, S.S. On the elimination of Y-bearing sperm. **Immunogenetics**, v.7, p.13-6, 1978.

OHNO, S. Expressin of X and Y linked genes during mammalian spermatogenesis. In: AMANN, R.P.; SEIDEL, G.E. ed. **Prospects for sexing mammalian sperm**, Boulder: Colorado Assoc. Unive. Press, p. 109-13., 1982.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A. And SUKO-PARRISH Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-69, 1995.

PEARSON, P.L. The use of new staining techniques for human chromosome identification. **J. Med. Genet.**, v.9, p. 264, 1972.

PETER, B. The Y chromosome in human spermatozoa. **Nature**, v. 226, p. 961-2, 1970.

PETER, A.T.; JONES, P.P.; ROBINSON, J.P. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: a rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. **Theriogenology**, v.40, p.1177-85, 1993.

RAHMAN, A.; DUTTA, J.C.; RAJKONWAR,C.K. A estudy on preservation of buffalo semen in teo extenders. **Buffalo Journal**, v.1. p. 57-60. 1988.

RAO,A.R. **Chages in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis**, DEPARTAMENTE OF OBSTETRICS ANS GYNAECOLOGY ROYAL VETERINARY COLLEGE, STOCKHOLM, SWEDEN, Stockholm, 1971.

RAIZADA,B.C., SATTAT, A. & RAMPACEK, G.B. PENDEY, M.D. A comoarative study of freezing buffalo semen in two dilutors. **II WORLD BUFFALO CONGRESS**, New Delhi, 1990 v.III, p.66-73.

RAMALHO,M.D.T., RODRIGUES,L.H., SILVA,C., SALOMONS, J.W., MOREIRA-FILHO, C.A.; HOSSEPIAN, V.F.M. Utilização de sêmen sexado por centrifugação em gradiente de densidade par inseminação artificial de novilhas da raça Holandesa. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n.1, p. 318 2000 (suplemento).

RIBEIRO, H.F.L.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S. & VALE, W.G. The use of thermoresistance teste for water buffalo semen (preliminary report). **WORLD VETERINARY CONGRESS**, 24, Rio de Janeiro, 1991.

ROMITTO,G.C., ZÜGE,R.M. BANABE,R.C. y BARNABE, V.H. Standardization of the hypoosmotic swelling test as a method to evaluate frozen-thawed buffalo semen in a yolk-glycine extenter, tests **VI WORLD BUFFALO CONGRESS** , in Maracaibo, Venezuela, 2001.

RORIE, R.W.; LESTER, T.D.; LINDSEY, B.R. and McNEW, R.W. Effect of timing of insemination on sex ratio in beef cattle. **Theriogenology**, v.51, p. 399, 1999^a

RORIE, R.W.; LESTER, T.D.; LINDSEY, B.R. and McNEW, R.W. Effect of timing of insemination on gender ratio in beef cattle. **Theriogenology**, v.52, p. 1035-41, 1999^b.

SARKAR,S. Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation *in vitro* fertilization medium. **Fertil. Steril.**, Birmingham v.42, n.6, p.899-905, 1984.

SHASTRY, P.R.; HEGDE, U.C.; RAO, S.S. Use of Ficoll-sodium metrizoate density gradient to separate human X and Y bearing spermatozoa. **Nature**, v.269, p.58-60, 1977.

SCHILLING, E. Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratio of born calves. **J. Reprod. Fert.**, v.11, p.460-72, 1966.

SCHREDER, V. Fiziko-Vhimicheskil analiz fiziologgii spermicv. Soobsbchenic, 5. Iskusst-vennaya regulyatsiya pola u mLekopitayushahixh. **Biol Zhurnal** v.3, p.465, 1934.

SCHWIDERSKI, H.*et al.* Mikroinjektion um "in vitro" befruchtung mit spermien aus versuchen zur anreicherung der geschlechtsspezifischen spermientypen beim rind. **Reprod. Domest. Anim.**, v.26, p.143-4, 1991.

SEIDEL JR., E.G. Sexing mammalian sperm-interwiing of commerce, technology, and biology. **Ani. Reprod. Scie.** v. 79, p. 145-56, 2003.

SHETTLES,L.B. Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature**, v.8, p.643, 1960.

SHETTLES,L.B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. **Fertil. Steril.**, v.12, p.502-8, 1961.

SHETTLES,L.B. Factors influencing sex ratios. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, v.8, p.643, 1970.

SOUSA, J.S.; SILVA, A.O.A.;RIBEIRO, H.F.L.; OHASHI, O.M.; SOUZA, H.E.M.; VALE, W.G. & REIS, A.N. Seasonal characteristics of buffalo semen in the amazon region. **Proceedings of the 4th SIPAR Follow-Up Seminar on Animal Reproduction and Biotechnology for Latin America**, Castanhal-PA, 1998, v.II, p. 82-87,

UNTERBERGER, F. Geschlechtsbestimmung und wasserstoffionenkonzentration. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 58, n.1, p. 729, 1932.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S.; OHASHI, O.M. Inseminação artificial em búfalos(*Bubalus bubalis*) na região amazônica. **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 19, Belém. Anais...1984, p. 91.

VALE, W.G. Collection, processing and deep freezing of buffalo semen. **Buffalo Journal**, v.2, p . 65-81. 1994.

VALE, W.G.; OHASHI, O.M.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, J.S. Semen freezing and artificial insemination in the water buffalo in the amazon valley. **Buffalo Journal**, v.2, p.137-144. 1991.

VALE,W.G.; SILVA,A.O.A.; SOUSA, J.S.; RIBEIRO, H.F.L.; SOUSA, H.E.M.;NAHÚM, B. de S.; OHASHI, O.M. Preliminary report on the use of

coconut water(*Cocos nucifera*) as a diluter of buffalo semen. **WORLD BUFFALO CONGRESS**, 5, Caserta, 1997, p. 836-839.

VALE, W.G.; NAHÚM, B. de S.; SILVA, A.O.A.; SOUSA, J.S.; SOUZA, H.E.M.; OHASHI, O.M. & RIBEIRO, H.F.L. Inseminação artificial em búfalos com sêmen congelado em diluente a base de água de coco (*Cocos nucifera*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.354-356. 1999.

VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E.; BRANDFORD-OLTENACU, E.A. **Genetic for the animal science**. New York: W.H. Freeman, cap. 13, p. 287-313, 1987.

VAN MUNSTER, E.B.; STAP, J. HOEBE, R.A.; TE MEERMAN, G.J. and ATEN, J.A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. **Theriogenology**, v.52, p.1281-93, 1999.

VERES, I. Negative electrical charge of the surface of bull sperm. **Mikroskopie**, v.23, p.166-9, 1968.

VESSELINOVITCHS.D. and MAC PHERSON, J.W. Eletrophoresis of bovine semen 4 Sex ratio in cattle resulting from electrophoretically treated semen. **Can. J. Comp. Med.**, Ottawa, v.23, p.375-376, 1959.

ZAVA, M. **Produção de búfalos**, Ed. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, p.188-9, Campinas-SP, 1984.

ZABORSKI, P. Detection of H-Y antigen on mouse sperm by use of *Staphylococcus aureus*. **Transplantation**, v.27, p.348, 1979.

ZARUTSKIE, P.W.; MULLER, C.H.; MAGONE, M.; SOULES, M.R. The clinical relevance of sex selection techniques. **Fertil. and Steril.**, v. 52, n. 6, p. 891-905, 1989.

ZAVOS, P.M. Preconception sex determination via intravaginal administration of H-Y antisera in rabbits. **Therioigenology**, Stoneham, v.20, n.2, p.235-40, 1983.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina, 1998.** Tese (Doutorado em reprodução animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP-Botucatu.

ZÜGE, R.M., ROMITTO, G.C. BARNABE, R.C. AND BARNABE, V.H. Buffalo frozen semen evaluation through hamster zone-free penetration and hypoosmotic swelling tests. **VI WORLD BUFFALO CONGRESS**, in Maracaibo, Venezuela, 2001.

WACHTEL, S.S. **H-Y antigen and biology of sex determination.** New York: Grune and Stratton, p. 302, 1983.

WAKIM, P.E. Determining the sex of baby rabbits by ascertaining the pH of the vagina of the mother before mating. **J. Am. Osteopath Assoc.**, v. 72, p.173, 1972.

WELSH, G.R.; HOUCK, D.W.; JOHNSON, L.A. Fluidic and optical modification to a FACS IV for flow sorting of X- and Y-bearing sperm based on DNA. **Cytometry**, v. 18, suppl, 7, p. 74, 1994 (Abstract).

WINDSOR, D.P.; EVANS, G.; WHITE, I.G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome bearing sperm: A review. **Reprod. Fertile. Dev.**, v.5, p.155-71, 1993.

WITHE, K.L. BRAUBURY, M.W., ANDERSON, G.B. Immunofluorescent detection of a male-specific factor on preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, n1, p. 275, 1984.

YANAGIMACHI, R.; NODA, D.; FUJIMOTO, M.; NICOLSON, L. The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. **Am. J. Anat.**, v. 135, p. 497-520, 1972.